

# **Efeito do silenciamento do gene *STEAP1* em células LNCaP submetidas ao tratamento com cabazitaxel ou enzalutamida**

**Daniel Soares Corrêa do Nascimento**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Biomédicas**  
(2<sup>o</sup> ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor Cláudio Jorge Maia Baptista  
Co-orientadora: Mestre Sandra Catarina Moreira Rocha

**Outubro de 2021**



# **Dedicatória**

Dedico esta tese ao meu pai (*in memoriam*) que sempre me ensinou que todos os sonhos são possíveis, e que devemos buscar realizar cada um deles, por mais que no momento não consigamos vislumbrar-lhos, mas sempre perseguir com foco, força e determinação.



# Resumo

O cancro de próstata (CaP) é o segundo com maior incidência no homem. As terapias farmacológicas mais utilizadas são as antineoplásicas (docetaxel ou cabazitaxel) e antiandrogénicas (enzalutamida ou apalutamida). Atualmente, investigam-se novos biomarcadores preditivos para deteção precoce, desenvolvimento de terapias combinadas e avaliação da resposta a terapia. Alguns desses potenciais biomarcadores encontram-se sobreexpressos no CaP, como por exemplo, a proteína Six Transmembrane Epitelial Antigen of the Prostate 1 (STEAP1), que é expressa nas células epiteliais e vários estudos indicam que a sobreexpressão da STEAP1 está associada à progressão do CaP.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se as células tumorais se tornam mais sensíveis ao tratamento com cabazitaxel ou enzalutamida, quando associado ao silenciamento do gene *STEAP1*, assim como avaliar se a sobreexpressão da STEAP1 pode ser utilizada como biomarcador preditivo na resposta ao tratamento.

Foi realizada a transfecção das LNCaP com um siRNA específico para o gene *STEAP1*, e como controlo as células foram transfectadas com um siRNA contendo uma sequência aleatória. Seguidamente, as células foram tratadas com cabazitaxel ou enzalutamida de forma a avaliar a influência da expressão da STEAP1 na viabilidade celular, proliferação celular, apoptose celular, migração e invasão celular.

Os resultados demonstraram que o silenciamento reduziu significativamente em 47% a viabilidade no grupo STEAP1 siRNA. entretanto, o tratamento com cabazitaxel reverte a diminuição da viabilidade. Constatamos que o grupo STEAP1+CBZ, apresentavam menor expressão de p-c-myc.

Assim, estes resultados preliminares podem indicar que a STEAP1 pode influenciar na resposta ao tratamento do CaP com cabazitaxel ou enzalutamida.

## Palavras-chave

Cabazitaxel; Cancro da próstata; Enzalutamida; LNCaP; STEAP1.



# Abstract

Prostate cancer (CaP) is the second with the highest increase in men. The most used pharmacological therapies are antineoplastic (docetaxel or cabazitaxel) and antiandrogenic (enzalutamide or apalutamide). Currently, new predictive biomarkers are being investigated for early detection, development of combined therapies and assessment of response to therapy. Some potential biomarkers are overexpressed in CaP, such as the Prostate Epithelial Transmembrane Antigen Six 1 (STEAP1) protein, which is expressed in epithelial cells, and several studies indicate that STEAP1 overexpression is associated with CaP progression.

The aim of this study was to assess whether tumor cells become more sensitive to treatment with cabazitaxel or enzalutamide, when associated with *STEAP1* gene silencing, as well as to assess whether STEAP1 overexpression can be used as a predictive biomarker in response to treatment.

Transfection of LNCaP with a specific siRNA for the *STEAP1* gene was performed, and as a control the cells were transfected with a siRNA containing a random sequence. Then, the cells were treated with cabazitaxel or enzalutamide to assess the influence of STEAP1 expression on cell viability, cell proliferation, cell apoptosis, cell migration and invasion.

The results showed that silencing significantly reduced viability by 47% in the STEAP1 siRNA group. However, treatment with cabazitaxel reverses the decrease in viability. We found that the STEAP1+CBZ group had lower expression of p-c-myc.

Thus, these preliminary results may indicate that STEAP1 may influence the response to CaP treatment with cabazitaxel or enzalutamide.

## Keywords

Cabazitaxel; Enzalutamide; LNCaP; Prostate cancer; STEAP1.



# Índice

<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1. Embriologia, Anatomia, Histologia e Fisiologia da Próstata .....	1
2. Cancro da Próstata .....	5
2.1. Epidemiologia e Fatores de Risco .....	5
2.2. Carcinogénese.....	7
2.2.1. Sinalização PTEN/PI3K/AKT/mTOR .....	8
2.3. Diagnóstico .....	11
2.4. Tratamento .....	14
2.4.1. Cabazitaxel .....	15
2.4.2. Enzalutamida .....	17
2.5. Six transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 1 .....	18
2.5.1. Funções e regulação da expressão da STEAP1 .....	19
2.5.2. O papel da STEAP1 como biomarcador .....	20
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
1. Cultura Celular .....	22
2. Desenho Experimental e Tratamento .....	22
2.1. Ensaio de Sensibilidade a Fármacos .....	22
2.2. Silenciamento do Gene <i>STEAP1</i> e Tratamento com Cabazitaxel (CBZ) e Enzalutamida (ENZA).....	23
3. Extração de RNA Total e qPCR .....	23

4. Extração de Proteína Total e Western Blot.....	24
5. Ensaio de Atividade de Caspase-3.....	25
6. Análise Estatística .....	25
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
1. Determinação do EC50 do Cabazitaxel e Enzalutamida.....	26
2. Efeito da terapia com Cabazitaxel ou Enzalutamida, associada ao silenciamento da STEAP1 .....	27
2.1. Análise da expressão da STEAP1.....	27
2.2. Avaliação da viabilidade e proliferação celular .....	29
2.3. Avaliação da apoptose .....	33
2.4. Avaliação da STEAP1 na migração e invasão .....	38
<b>V. CONCLUSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>

# Lista de Figuras

<b>FIGURA I. 1</b>	Desenvolvimento da próstata .....	1
<b>FIGURA I. 2</b>	Fotomicrografia da próstata humana .....	2
<b>FIGURA I. 3</b>	Representação anatómica da próstata humana.....	3
<b>FIGURA I. 4</b>	Locus, organização genómica e estrutura do recetor de androgénio .....	4
<b>FIGURA I. 5</b>	Modulação do recetor de androgénio (AR) na célula da próstata .....	5
<b>FIGURA I. 6</b>	Número estimado de novos casos de cancro da próstata no mundo por continente em 2020 .....	6
<b>FIGURA I. 7</b>	Número estimado de novos casos e mortes por cancro da próstata em portugal no ano de 2020 .....	6
<b>FIGURA I. 8</b>	Via de progressão do cancro da próstata humano.....	8
<b>FIGURA I. 9</b>	Descrição do eixo de sinalização PTEN/PI3K/AKT/mTOR.....	9
<b>FIGURA I. 10</b>	Descrição da interação do eixo de sinalização PTEN/PI3K/AKT/mTOR com as vias AR, MAPK e Wnt.....	11
<b>FIGURA I. 11</b>	Descrição dos padrões típicos encontrados no novo sistema de graduação de gleason .....	12
<b>FIGURA I. 12</b>	Descrição do mecanismo de ação do cabazitaxel .....	16
<b>FIGURA I. 13</b>	Descrição do mecanismo de ação da enzalutamida .....	17
<b>FIGURA I. 14</b>	Estrutura prevista da STEAP1 e algumas das suas funções.....	19
<b>FIGURA IV. 1</b>	Determinação de EC50 para cabazitaxel e enzalutamida.....	26
<b>FIGURA IV. 2</b>	Efeito do silenciamento do gene <i>STEAP1</i> em células LNCAP, associado a terapia com cabazitaxel (CBZ) e enzalutamida (ENZA).....	29
<b>FIGURA IV. 3</b>	Análise da viabilidade celular pelo ensaio MTT.....	30
<b>FIGURA IV. 4</b>	Efeito do silenciamento do gene <i>STEAP1</i> na proliferação .....	31
<b>FIGURA IV. 5</b>	Avaliação do nível de expressão da caspase 3 em células LNCAP silenciadas para o <i>STEAP1</i> e expostas a cabazitaxel (CBZ) e enzalutamida (ENZA) .....	34
<b>FIGURA IV. 6</b>	Efeito do silenciamento do gene <i>STEAP1</i> nos níveis de expressão dos reguladores do ciclo celular p21 e p53.....	36
<b>FIGURA IV. 7</b>	Efeito do silenciamento do gene <i>STEAP1</i> em células LNCAP expostas a cabazitaxel (CBZ) e enzalutamida (ENZA) nos níveis de expressão da proteína Bax e Bcl-2 .....	37
<b>FIGURA IV. 8</b>	Efeito do silenciamento do gene <i>STEAP1</i> na migração celular através da avaliação dos níveis de expressão da proteína e-caderina .....	39



# Lista de Tabelas

<b>TABELA I. 1</b> Genes expressos no cancro da próstata.....	14
---	----



# Lista de Acrónimos

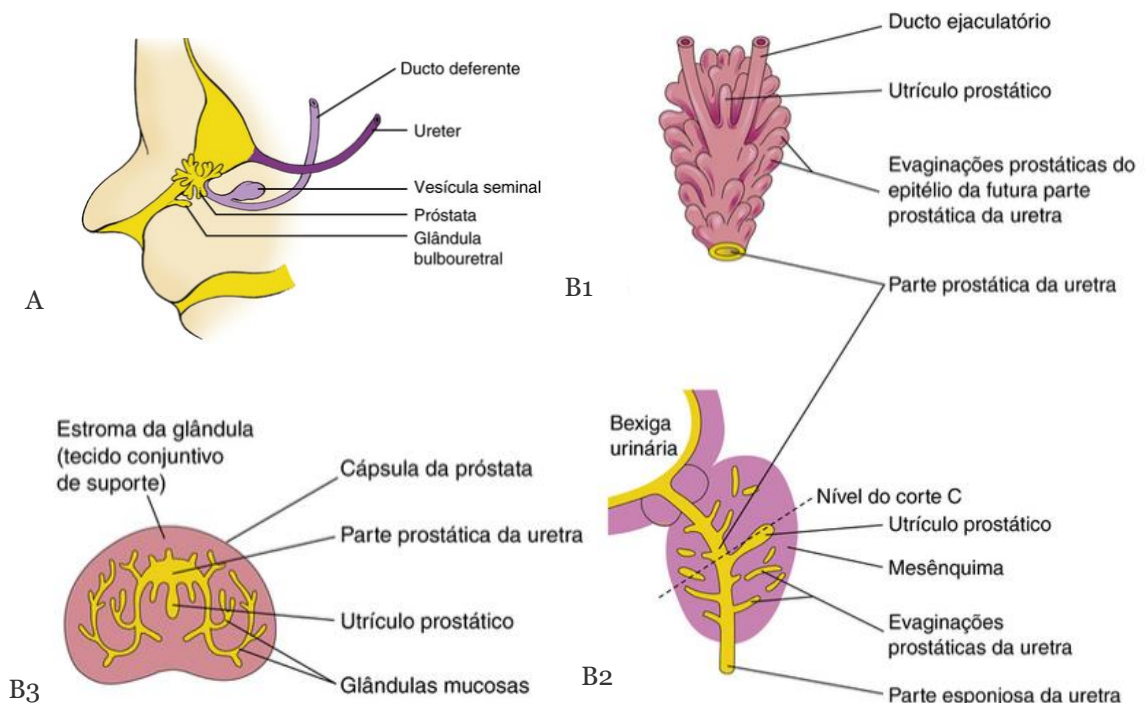
ADT	Terapia de Privação de Androgénios
AR	Recetor Androgénios
AREs	Elementos de Resposta aos Androgénios
BPH	Hiperplasia Prostática Benigna
CBZ	Cabazitaxel
CaP	Cancro de Próstata
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DRE	Exame Retal Digital
ENZA	Enzalutamida
EC <sub>50</sub>	Metade da Concentração Efetiva Máxima
FBS	Soro Fetal Bovino
GnRH	Hormona Libertadora de Gonadotrofinas
GSK3	Glicogénio Cinase Sintase 3
HIF-1 $\alpha$	Fator 1-Alfa Induzível de Hipoxia
HSP	Proteína de Choque Térmico
LBD	Domínio C-terminal de Ligação ao Ligando
LH	Hormona Luteinizante
LNCaP	Carcinoma de linfonodo da próstata
mCRPC	Cancro de Próstata Metastático Resistente à Castração
MRI	Ressonância Magnética Multiparamétrica
NTD	Domínio Aminoterminal
PCA3	Antígeno 3 do Cancro da Próstata

PIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática
PI3K	Enzima Fosfatidil-Inositol-3-Cinase
PSA	Antígeno Prostático Específico
PTEN	Fosfatase e Homólogo de Tensina
RIPA	Ensaio de Radioimunoprecipitação
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RT	Terapia de Radiação
SHBG	Globulina de Ligação ao Hormônio Sexual
STEAP1	Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 1
T	Testosterona
TRUS	Ultrassom Transretal

# I. Introdução

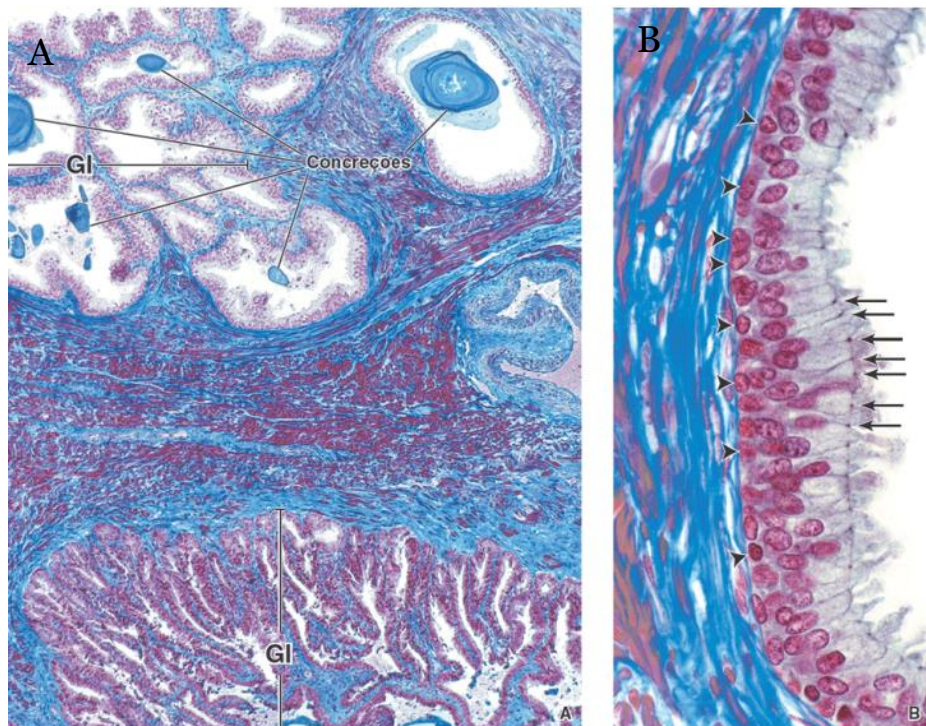
## 1. Embriologia, Anatomia, Histologia e Fisiologia da Próstata

A próstata é uma glândula acessória do sistema reprodutor masculino, seu desenvolvimento é caudal ao colo da bexiga, através da proliferação de botões epiteliais que se estendem do epitélio do seio urogenital (origem endodérmica). Os botões da próstata invadem locais caracterizados que padronizam o desenvolvimento dos lobos distintos da próstata. A invasão dos botões epiteliais por condensação mesenquimal, levam as células que constituem o tecido conjuntivo a diferenciar-se em elementos do estroma e assim tornando-se compactadas. Este processo de condensação é independente da ação dos androgénios. Diferentemente, o brotamento epitelial é dependente de androgénios e um dos eventos primários no desenvolvimento prostático, onde o mesênquima do seio urogenital, expressa o recetor de androgénios (AR) e regula a morfogénese ductal. Em humanos, o brotamento da próstata ocorre durante a 10<sup>o</sup> semana de gestação (Figura I. 1). É de realçar que o nível de androgénio é essencial para a diferenciação prostática (como ramificação e canalização) e para o crescimento do embrião (Wein *et al.*, 2015).



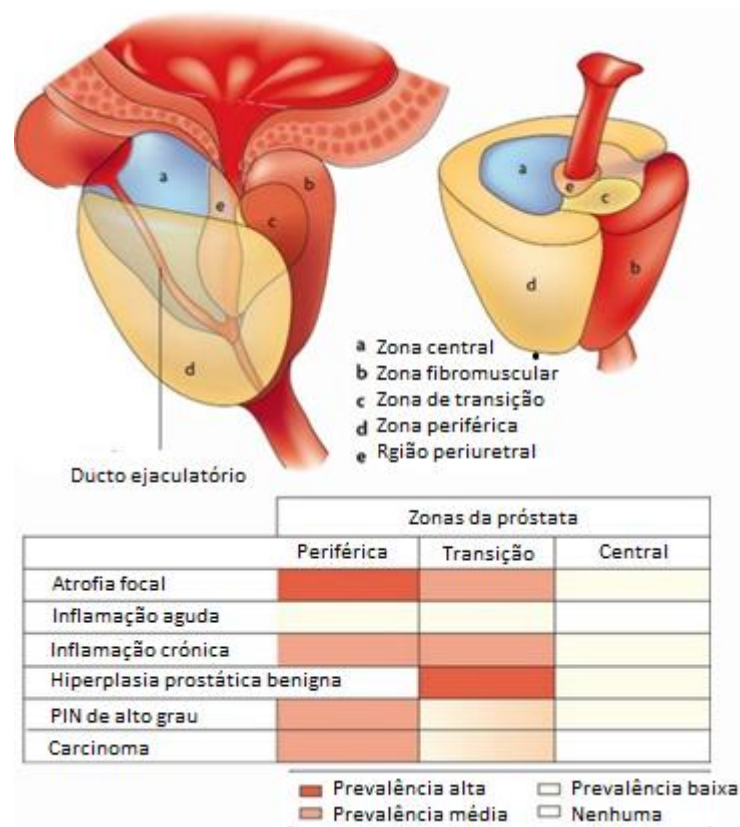
**Figura I. 1** (A) Desenvolvimento da próstata a partir do epitélio do seio urogenital, entre a 10<sup>a</sup> e a 12<sup>a</sup> semana. (B1) visão dorsal do desenvolvimento da próstata, observando a diferenciação prostática com ramificações (11<sup>a</sup> semana). (B2) secção mediana da próstata, constatando a canalização e evaginações prostáticas (16<sup>a</sup> semana). (B3) Exibe uma secção diagonal no nível de corte, mostrado em B2 (adaptado de (Moore, Persaud and Torchia, 2016; SCHOENWOLF *et al.*, 2016).

A próstata é um órgão fibromuscular e glandular com localização na região pélvica abaixo da bexiga e envolve uma parte da uretra. Tem um tamanho aproximado de uma bola de golfe e mede 4 cm lateralmente, cerca de 3 cm desde o topo até à parte inferior e 2 cm desde a região anterior até à posterior (McAninch, 2014). Histologicamente, a próstata é composta por 30 a 50 glândulas tubuloalveolares (com epitélio cuboide simples ou pseudoestratificado colunar (Figura I. 2)) organizadas em três camadas concêntricas: mucosa interna, submucosa intermediária e camada periférica. O parênquima prostático adulto é dividido em cinco zonas distintas (Figura I. 3): zona central (compreende 25% do tecido glandular prostático e sem ocorrência de carcinoma e inflamação), zona fibromuscular (apresentando tecido conjuntivo denso e fibras musculares lisas), zona de transição (com 5% do tecido glandular prostático e zona com maior prevalência de hiperplasia prostática benigna (BPH)), zona periférica (onde se encontram 70% das glândulas prostáticas e mais associada ao desenvolvimento de carcinoma) e a região periuretral (contém glândulas mucosas/submucosas e na BPH avançada esta zona pode sofrer compressão). Com esta divisão foi possível avaliar a predisposição e/ou incidências por cancro ou outras patologias que ocorrem em cada zona da próstata (Figura I. 2) (De Marzo et al., 2016; Ross, 2016; Junqueira, 2018).



**Figura I. 2** Fotomicrografia da próstata humana. A. Amostra da próstata corada com Mallory-Azan, evidenciando as glândulas tubuloalveolares (GI) e o tecido fibromuscular (músculo liso corado em vermelho e tecido conjuntivo denso corado em azul). 60x. B. Nesta amplificação é possível observar que o epitélio glandular é pseudoestratificado. As setas indicam os núcleos das células basais, assim como a região apical das células secretoras (núcleos alongados). 635x. (adaptado de (Ross, 2016)).

A próstata é responsável pela produção e secreção de um fluido leitoso que contém diversas substâncias, como por exemplo: o ácido cítrico que é utilizado pelos espermatozoides para a síntese de ATP; Enzimas proteolíticas (como o antigénio específico da próstata (do inglês PSA), pepsinogénios, lisozima, amílase e hialuronidase) que hidrolisam as proteínas de coagulação das glândulas seminais; Fosfatase ácida; Zinco; Sacarose; e Plasmina seminal com ação antibiótica. As secreções prostáticas constituem aproximadamente 25% do volume do sêmen, auxiliando na motilidade e viabilidade dos espermatozoides (Tortora, 2016). Esta produção ocorre pela ação dos androgénios (Ross, 2016; Junqueira, 2018).

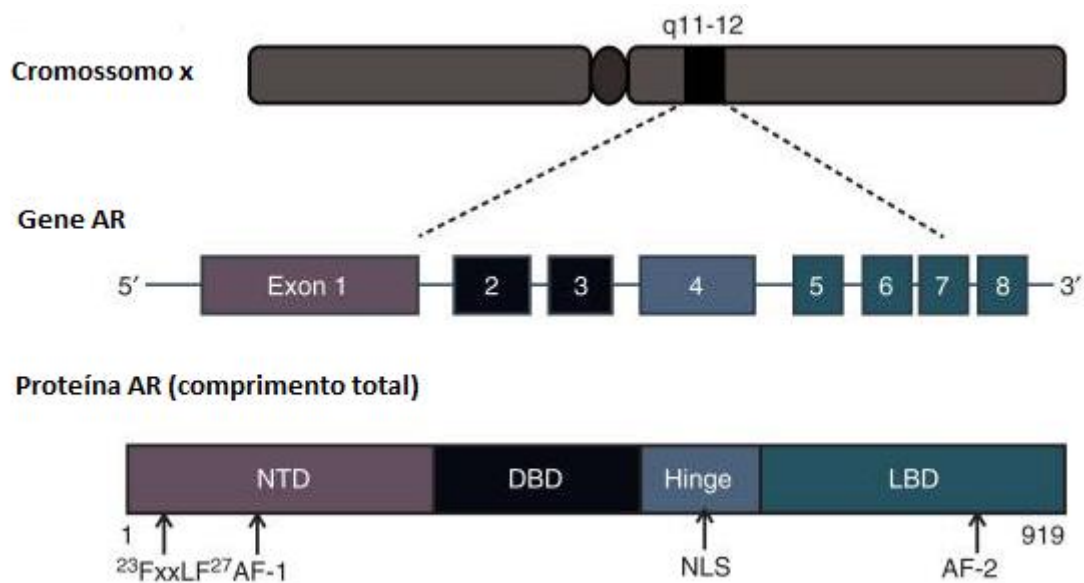


**Figura I. 3** Representação anatómica da próstata humana (adaptado de (De Marzo *et al.*, 2016)).

Os androgénios desempenham um papel fundamental na diferenciação da próstata, estimulando o desenvolvimento e manutenção (Basu and Tindall, 2010). A testosterona, principal androgénio circulante, é uma hormona esteroide sintetizada a partir do colesterol. A produção da testosterona ocorre principalmente nas células de Leydig sob estímulo da hormona luteinizante (LH), cuja secreção é regulada pela hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH). Nomeadamente a dihidrotestosterona (DHT),

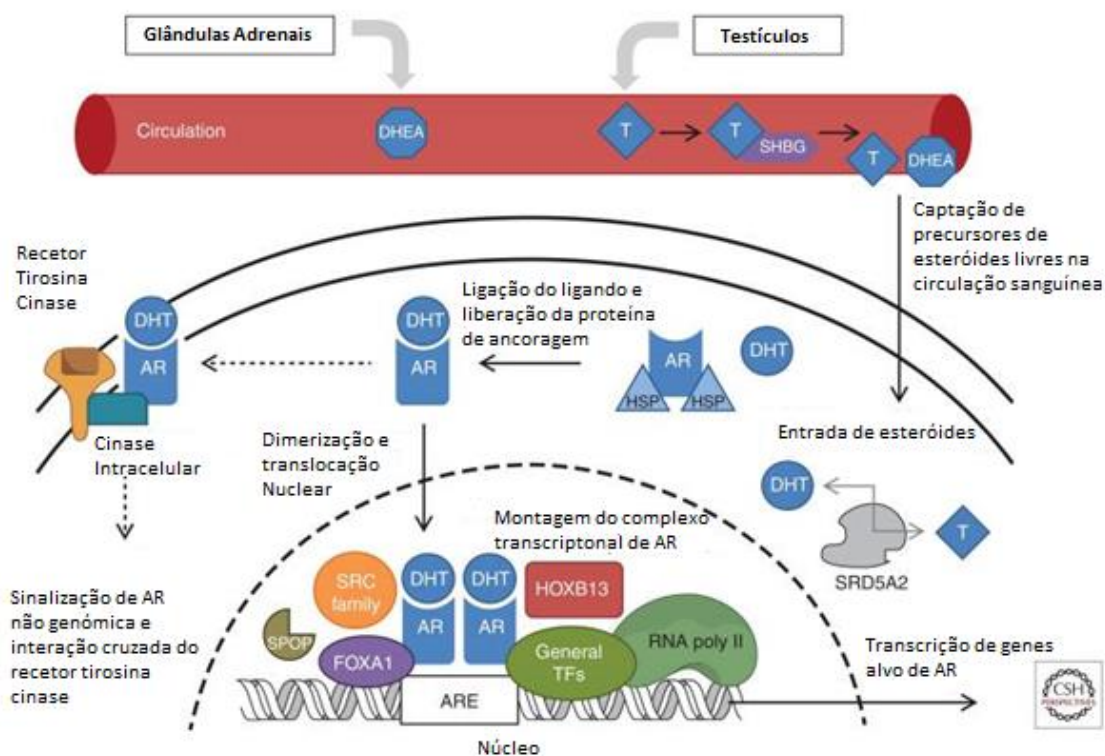
sintetizada a partir da testosterona pela enzima 5 $\alpha$ -redutase, nas células epiteliais. A DHT ativa o AR, que transloca-se para o núcleo, interagindo com os elementos de resposta aos androgénios (do inglês AREs) presentes nas regiões reguladoras de diversos genes associados à proliferação das células prostáticas (Ross, 2016; Dai, Heemers and Sharifi, 2017; Gibson, Saunders and McEwan, 2018; Hunter *et al.*, 2018; Junqueira, 2018).

O gene AR, constituído por 8 exões, está localizado no cromossomo X (q11-12) e codifica uma proteína com 919 aminoácidos e um peso molecular de 110 kDa (Figura I. 4). O AR é expresso principalmente nas células epiteliais luminiais, e atua como um fator de transcrição nuclear dependente de ligando, pertencente a superfamília de recetores das hormonas esteroides. O AR apresenta três domínios funcionais principais: domínio aminoterminal (NTD), domínio de ligação ao DNA (DBD) e domínio C-terminal de ligação ao ligando (LBD), a união de DBD e LBD, que é realizada através da região de dobradiça flexível (Dai, Heemers and Sharifi, 2017).



**Figura I. 4** Locus, organização genómica e estrutura do recetor de androgénio. (adaptado de (Dai, Heemers and Sharifi, 2017)).

Quando AR está não associado ao ligando, encontra-se no citoplasma ligado a um complexo de proteínas de choque térmico (HSP-90, HSP-70 e HSP-56), evitando assim a degradação do recetor. Após interação com a DHT, este complexo se dissocia, iniciando uma sequência de eventos que leva a ativação, como crescimento e proliferação (Figura I. 5) (McCrea *et al.*, 2016; Dai, Heemers and Sharifi, 2017).

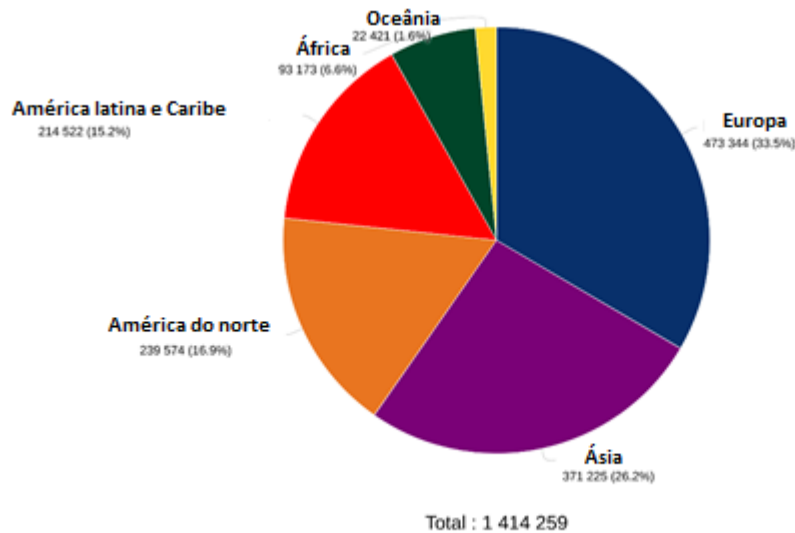


**Figura I. 5** Modulação do recetor de androgénio (AR) na célula da próstata. Desidroepiandrosterona (DHEA); Globulina de ligação ao hormônio sexual (SHBG); Testosterona (T); Dihidrotestosterona (DHT); Proteína de choque térmico (HSP) (adaptado de (Dai, Heemers and Sharifi, 2017)).

## 2. Cancro da Próstata

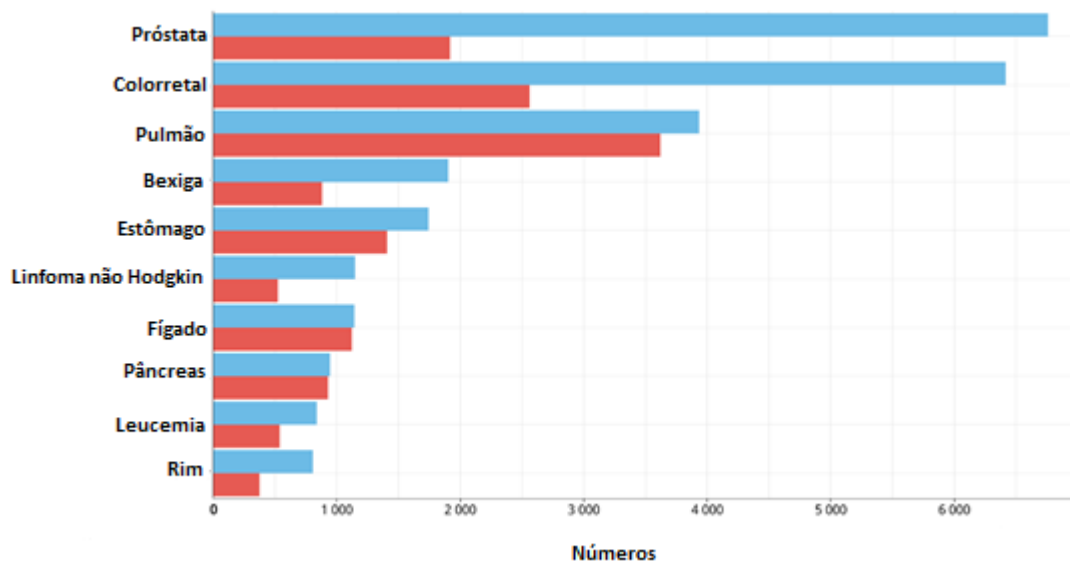
### 2.1. Epidemiologia e Fatores de Risco

O cancro de próstata (CaP) é multifatorial e é o segundo tipo de cancro com maior incidência no homem, com 1.414.259 novos casos mundialmente (Figura I. 6). Agrupando o número de novos casos de forma decrescente, temos: Europa 449.761 (35,2%), Ásia 297.215 (23,3%), América do Norte 234.195 (18,4%), América Latina e Caribe 190.385 (14,9%), África 80.971 (6,3%) e Oceânia 23.496 (1,8%). Relativamente à taxa de mortalidade por CaP no mundo, observa-se resultados diferentes: Ásia 118.427 (33%), Europa 107.315 (29,9%), América Latina e Caribe 53.798 (15%), África 42.298 (11,8%), América do Norte 32.676 (9,1%) e Oceânia 4.465 (1,2%) (Sung et al., 2021).



**Figura I. 6** Número estimado de novos casos de cancro da próstata no mundo por continente em 2020 (adaptado de (Sung *et al.*, 2021)).

Em Portugal, no ano 2020 o CaP foi o mais incidente em homens com 6.759 novos casos e 1.917 mortes (Figura I. 7). A incidência mostra-se maior em relação à mortalidade, podendo estar atribuída aumento do diagnóstico com a utilização do teste do antígeno específico da próstata (PSA). É notório que o teste do PSA foi um marco para o diagnóstico do cancro da próstata no mundo, o que se reflete nos dados de incidência (Taitt, 2018; Rawla, 2019; Sung et al., 2021).



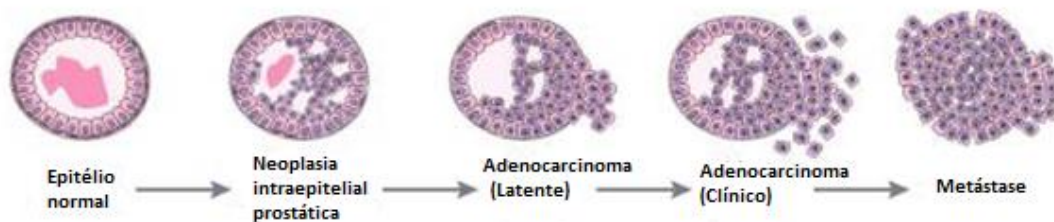
**Figura I. 7** Número estimado de novos casos (Azul) e mortes (Vermelho) por cancro da próstata em Portugal no ano de 2020 (adaptado de (Sung *et al.*, 2021)).

Etiologicamente, o cancro da próstata não é bem compreendido, visto que é clinicamente heterogêneo. Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do cancro da próstata são a idade, etnia e o histórico familiar. É observada uma forte associação com a idade, em que existe um aumento acentuado na taxa de incidência a partir dos 55 anos de idade (Ferlay et al., 2015). Relativamente à etnia, é observada uma maior incidência em indivíduos negros, além de uma mortalidade 2,4 vezes maior de homens negros quando comparados com homens brancos (Perez-Cornago et al., 2017; Pernar et al., 2018).

É também indicativo que o histórico familiar pode influenciar a ocorrência do cancro da próstata, em que a probabilidade de desenvolver cancro da próstata está aumentada em três vezes em homens que tenham um parente de primeiro grau (pai ou irmão) com cancro da próstata, e o risco sobe nove vezes, se ambos (pai e irmão) tiveram cancro da próstata. Em estudos realizados com gémeos, foi observado que a herança familiar para o CaP advém de fatores genéticos compartilhados, estimando uma alta hereditariedade (57%). Uma coorte identificou variações no genes *LEPR*, *CRYI*, *RNASEL*, *IL4* e *ARVCF*, associadas ao CaP letal em homens com histórico familiar (Karyadi et al., 2015; Mucci et al., 2016; Perez-Cornago et al., 2017; Pernar et al., 2018).

## **2.2. Carcinogénese**

Apesar do cancro da próstata (CaP) apresentar uma heterogeneidade fenotípica, mais de 95% dos tumores são adenocarcinomas, sendo a maioria correspondente a adenocarcinomas acinares com expressão do AR. Existem outros tipos mais raros, como o adenocarcinoma ductal, carcinoma mucinoso e carcinoma de anel de sinete. A transformação das células prostáticas envolve um processo com várias etapas. É descrito como sendo iniciado na neoplasia intraepitelial prostática (PIN), seguida pelo cancro da próstata localizado, evoluindo para o adenocarcinoma de próstata avançado com invasão local, e que culmina no cancro da próstata metastático (Figura I. 8) (Shen and Abate-Shen, 2010; Wang et al., 2018). Vários estudos indicam que o PIN de alto grau é o precursor do adenocarcinoma da próstata.



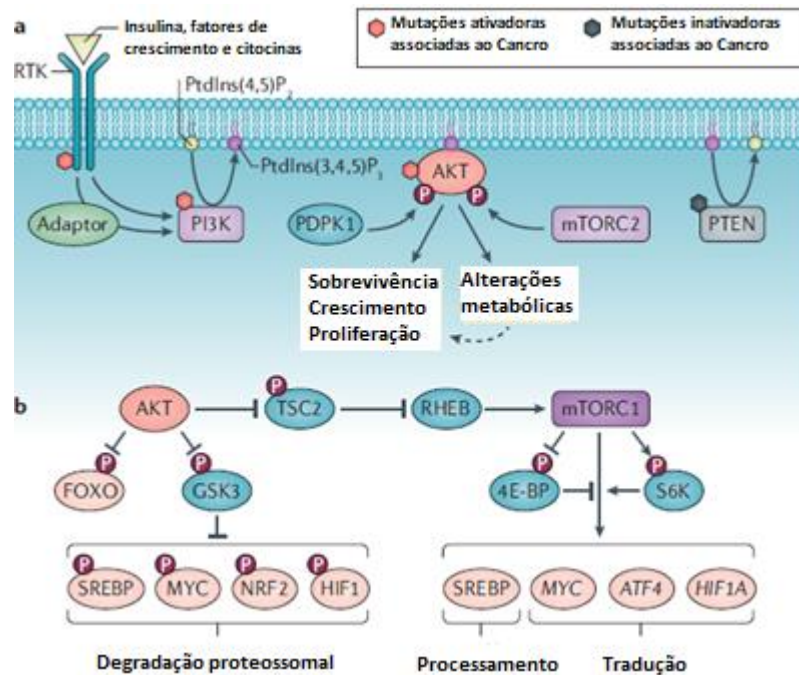
**Figura I. 8** Via de progressão do cancro da próstata humano. (adaptado de (Shen and Abate-Shen, 2010)).

Histologicamente, a PIN é caracterizada com o surgimento de hiperplasia epitelial luminal, em que se observa uma redução das células basais, expansão dos núcleos e nucléolos, hipercromasia citoplasmática, e atipia nuclear (Shen and Abate-Shen, 2010; Wang et al., 2018). Na PIN de alto grau, geralmente ocorre um aumento dos marcadores de proliferação celular (Shen and Abate-Shen, 2010). Através do sistema de classificação de Gleason foi possível identificar os padrões histológicos e definir a agressividade do cancro da próstata, sendo um dos fatores de maior importância para o prognóstico e resultados clínicos (Shen and Abate-Shen, 2010; Cimadamore et al., 2020). O CaP é descrito com heterogéneo pelo fato de inúmeras alterações poderem levar ao desenvolvimento do cancro da próstata, como mudanças genéticas (via PI3K/AKT/mTOR, c-MYC, P53 e AR) e epigenéticas (remodelação da cromatina e metilação do DNA) (Shtivelman, Beer and Evans, 2014).

### 2.2.1. Sinalização PTEN/PI3K/AKT/mTOR

A enzima fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K) e seus efetores regulam funções cruciais nas células (Figura I. 9), como o ciclo celular, sobrevivência, migração, angiogénese e metabolismo. Um ponto central associado ao cancro, incluindo o da próstata é a desregulação da via PI3K, que podem conduzir a uma ativação constitutiva desta via. A ativação da sinalização aberrante da via PI3K é observada em 40% dos diagnósticos precoces e em mais de 70% dos casos avançados do CaP. A PTEN (fosfatase e homólogo de tensina) apresenta um papel de regulador negativo da sinalização da PI3K, diminuindo a formação do segundo mensageiro PIP3 (fosfatidilinositol-3-fosfato), ou seja, promove a desfosforilação na posição 3', o que conduz à inibição da AKT, e consequentemente, não ativa o mTOR (alvo mecanístico da rapamicina). Em alguns tipos de CaP ocorrem mutações na enzima PTEN, promovendo o aumento do PIP3, ativando a via PTEN/PI3K/AKT/mTOR, induzindo proliferação, crescimento e sobrevivência celular. Esta perda da atividade reguladora da PTEN ocorre em

aproximadamente 30% dos tumores primários da próstata e em 60% dos tumores resistentes à castração (Braglia et al., 2020; Hoxhaj and Manning, 2020).



**Figura I. 9** Descrição do eixo de sinalização PTEN/PI3K/AKT/mTOR. As marcações com hexágonos identificam as proteínas que são mais comuns de ocorrer mutações por ativação ou inativação no cancro. a: Mecanismo de ativação da AKT. b: AKT controlando o metabolismo celular, através de três substratos (TSC2, GSK3 e FOXO). Ativando mTORC1 que estimula o processamento de SREBP e tradução de mRNA dos fatores de transcrição de MYC, ATF4 e HIF1A. Abreviaturas: PI3K, fosfatidil-inositol 3-cinase; GSK3, glicogénio cinase sintase 3; AKT, homólogo do oncogene viral de timoma de murídeo v-akt; PTEN, fosfatase e homólogo de tensina; mTORC1, alvo mecanístico do complexo 1 de rapamicina; mTORC2, alvo mecanístico do complexo 2 de rapamicina (adaptado de (Hoxhaj and Manning, 2020)).

A AKT pertence à subfamília das proteínas cinase serina/treonina, e é considerada um alvo promissor na terapia do CaP, visto ser a principal efectora da PI3K e por ser ativada por múltiplas cinases, como por exemplo a PDK1 e mTORC2 (Figura II. 4). O PIP3 induz uma alteração conformacional da AKT, permitindo a fosforilação pela PDK1 e mTORC2, aumentando desta forma a atividade da AKT. A AKT ativa, fosforila (inibindo ou ativando) uma diversa gama de substratos como FOXO, GSK3 (glicogénio cinase sintase 3) e TSC2, levando ao crescimento celular, proliferação, sobrevivência e alterações metabólicas (Figura I. 9) (Braglia et al., 2020; Hoxhaj and Manning, 2020).

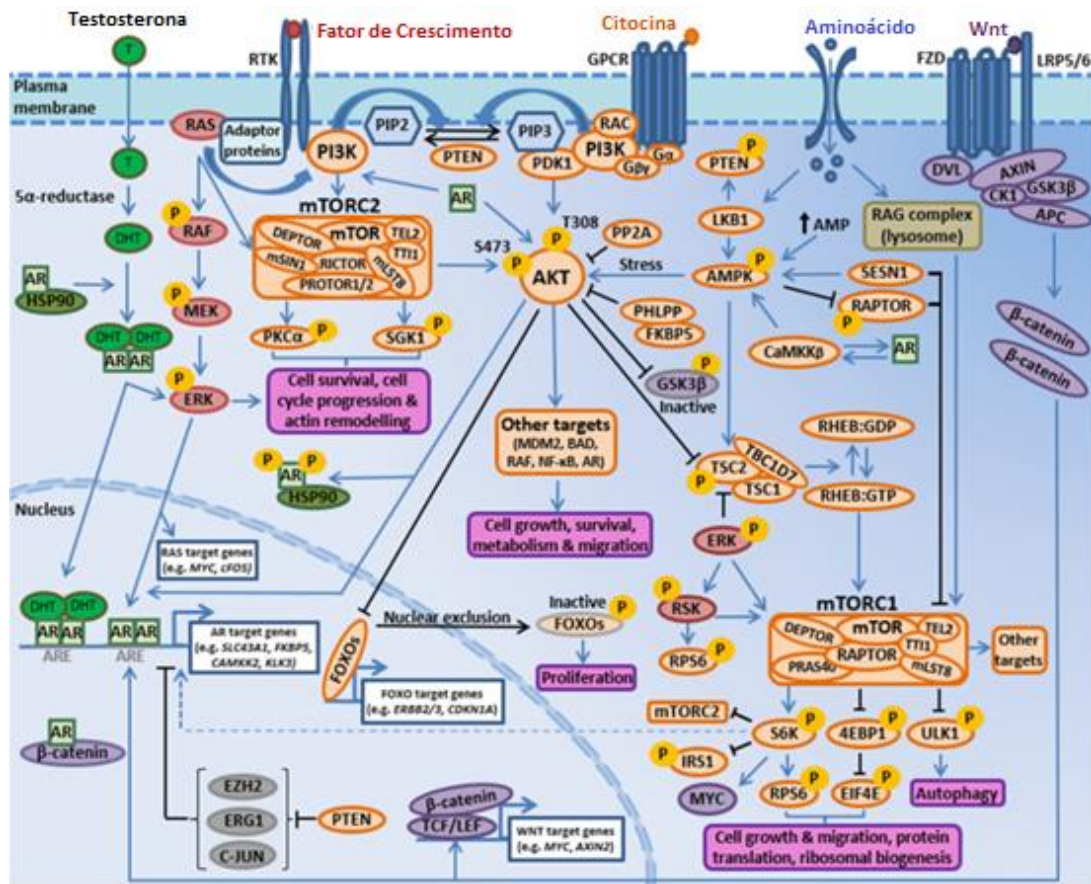
A GSK3 é uma proteína cinase serina/treonina, apresentando duas isoformas GSK3 $\alpha$  e GSK3 $\beta$ , que quando ativas fosforilam diversos substratos, incluindo membros da família pró-sobrevivência (BCL-2, MCL-1 e c-Myc), levando ao reconhecimento por ligases de ubiquitina E3, direcionando-os para a degradação nos proteassomas. Com ativação da

AKT, a GSK3 sofre uma fosforilação inibitória, promovendo uma estabilização dos seus substratos. Deste modo, a AKT atua como um regulador positivo da proliferação, sobrevivência e metabolismo celular (Braglia et al., 2020; Evangelisti et al., 2020).

Outra via mediada pela GSK3 é através da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina. A isoforma GSK3 $\beta$  é crucial na degradação da  $\beta$ -catenina através dos proteassomas. Entretanto, a inibição da GSK3 $\beta$  permite a estabilização da  $\beta$ -catenina, e consequentemente deslocamento para o núcleo, interagindo com fatores de transcrição Tcf e Lef, os quais ativam a transcrição de genes envolvidos com a proliferação e invasão. É importante destacar que a fosforilação por AKT inibe GSK3, mas esta inativação pode não afetar os níveis de  $\beta$ -catenina e nem sempre inibe completamente a GSK3 (Braglia et al., 2020; Evangelisti et al., 2020; Shorning et al., 2020).

A via PTEN/PI3K/AKT/mTOR possui interações com outras vias, como as vias da RAS/MAPK e AR (Shorning et al., 2020). A via PI3K classe IA apresenta-se em oposição as vias AR, RAS/MAPK e Wnt (Figura I. 10) (Shorning et al., 2020).

O c-Myc é um fator de transcrição, que regula a transcrição de genes associados à proliferação, diferenciação, apoptose e motilidade. O c-Myc é sobreexpresso em diversos tipos de cancro, e esta sobreexpressão pode resultar de mutações somáticas que inativam a PTEN (Dong et al., 2019). Outro mecanismo descrito para a sobreexpressão do c-Myc, é devido à fosforilação da Ser62 pela ação ERK, aumentando a estabilidade e tempo de meia-vida do c-Myc (Sears et al., 2000; Tsai, Chao and Lin, 2016). O aumento da expressão do c-Myc é observado em 37% dos pacientes com cancro da próstata metastático e está associado a uma baixa taxa de sobrevida (Labbé and Brown, 2018). Deste modo, a via de sinalização PTEN/PI3K/AKT/mTOR, assim como outras cascatas de sinalização oncogénica, podem cooperar, no sentido de promover a iniciação e progressão do cancro da próstata (Shorning et al., 2020).

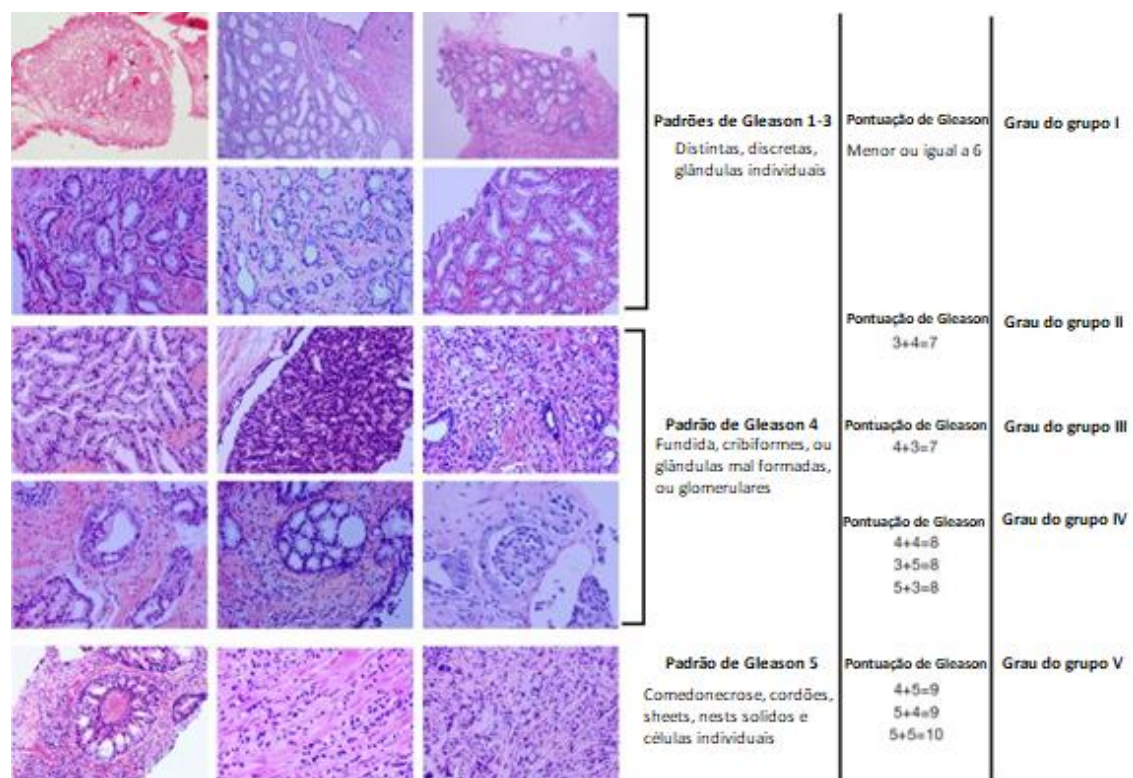


**Figura I. 10** Descrição da interação do eixo de sinalização PTEN/PI3K/AKT/mTOR com as vias AR, MAPK e Wnt. No modelo de sinalização PTEN/PI3K/AKT/ mTOR via PI3K classe IA e a diafonia com as cascatas de sinalização de AR, RAS/MAPK E Wnt (adaptado de (Shorning et al., 2020)).

### 2.3. Diagnóstico

Tradicionalmente, o rastreamento do cancro da próstata, tem sido através da determinação dos níveis séricos do PSA e/ou Exame retal digital (DRE). O DRE, em que o médico examina a próstata pelo toque manual para identificação de anomalias de volume e dureza, apresenta limitações. A principal limitação deste exame deve-se ao fato de alguns tumores pequenos e localizados na parte anterior ou mediana não serem detetados na apalpação. Então, o valor preditivo positivo, a sensibilidade e especificidade são baixos. A elevação do PSA na corrente sanguínea, ocorre devido ao rompimento do tecido nos ductos prostáticos com libertação do PSA. O aumento do PSA no sangue não é específico do CaP, podendo ter origem noutras causas, como por exemplo na BPH, prostatite, retenção urinária ou instrumentação (biópsia da próstata). Portanto, um valor elevado de PSA pode ser de difícil interpretação, devido a uma baixa especificidade (Dunn, 2017; Reda et al., 2018).

Se o PSA e/ou DRE apresentar um resultado suspeito, o paciente é submetido a uma biópsia (por agulha) guiada por ultrassom transretal (do inglês TRUS), onde se obtém uma pequena amostra do tecido prostático para avaliação histológica, podendo confirmar, ou não, a presença de cancro. Na avaliação da amostra, o patologista utiliza o sistema de classificação de Gleason (Figura I. 11), onde é avaliado os 2 padrões de tumor mais predominante na amostra, sendo cada padrão determinado numa escala de 1 a 5, onde 5 representa um tumor mais agressivo e menos diferenciado. Com este sistema é possível agrupar e classificar I a V (Chen and Zhou, 2016; Dunn, 2017; Reda et al., 2018).



**Figura I. 11** Descrição dos padrões típicos encontrados no novo sistema de graduação de Gleason. Fotomicrografia da próstata humana corados com hematoxilina e eosina com aumento 100x e 200x (adaptado de (Chen and Zhou, 2016)).

A utilização da ressonância magnética multiparamétrica (MRI) no diagnóstico do cancro da próstata, veio como uma nova alternativa na avaliação inicial de um nível elevado de PSA, evitando assim a biópsia guiada por ultrassom transretal (TRUS) com resultado negativo e melhorando a precisão da TRUS pela utilização prévia da MRI. Um estudo prospetivo e multicêntrico realizou uma comparação da precisão diagnóstica com MRI e TRUS na deteção de pontuações de Gleason  $\geq 7$ , obtendo uma sensibilidade 87% e valor preditivo negativo de 72% para MRI, e TRUS alcançou uma sensibilidade 60% e valor preditivo negativo de 65%. Este estudo também observou que 27% dos homens evitam uma biópsia desnecessária com a utilização prévia de MRI e ainda aumentaram a deteção de CaP em 18% (Ong et al., 2020).

No sentido de melhorar o diagnóstico do CaP, atualmente estão em estudos novos biomarcadores para uma detecção precoce, avaliação do estadiamento, e resposta à terapêutica. Visto as limitações e inconsistências encontradas no teste de PSA como marcador de diagnóstico e prognóstico do cancro da próstata, atualmente nos EUA estão a ser utilizados 3 biomarcadores (PSA, PHI e PCA3) na prática clínica. Para além disso, existem outros biomarcadores em desenvolvimento (4K SCORE (PSA total, fPSA, PSA intacto e hK2), ExoDX Prostate (RNA exossômico (PCA3 e ERG)), MiPS (PCA3 e TMPRSS2-ERG), SelectMDX (HOXC6 e DLX1), ConfirmMDX (Hipermetilação do ADN (GSTP1, APC e RASSF1)), Prolaris (31 genes pela expressão do mRNA (progressão do ciclo celular)), Oncotype DX (17 genes pela expressão do mRNA), Decipher (22 genes pela expressão do mRNA) e Promark (Avaliação de 8 proteínas)) (Ferro et al., 2016; Chistiakov et al., 2018; Kohaar, Petrovics and Srivastava, 2019).

O PHI (Índice de saúde da próstata) realiza a medição das três formas de PSA (PSA total, PSA livre e pró-PSA) em amostras de soro. Através da análise de PHI é possível a diferenciação de casos de BPH e cancro da próstata. Vários estudos multicêntricos internacionais observaram que o PHI apresenta melhores resultados no diagnóstico de CaP geral ou de alto grau, em relação ao PSA total e livre (Ferro et al., 2016; Chistiakov et al., 2018; Kohaar, Petrovics and Srivastava, 2019).

O antígeno 3 do cancro da próstata (PCA3) é um RNA não codificante especificamente expresso na próstata, que é sobreexpresso no CaP. A sua descoberta foi baseada na regulação da sobrevivência celular mediada pelo AR, cofatores de AR e pela expressão de genes pro-carcinogénicos envolvidos na transição epitelial-mesenquimal. Clinicamente, o PCA3 é um promissor marcador, visto que a sua expressão é identificada especificamente no CaP e não é observada noutras patologias prostáticas, como HPB, proliferação atípica de pequenos acinares, prostatite e PIN (Ferro et al., 2016; Chistiakov et al., 2018; Kohaar, Petrovics and Srivastava, 2019).

Os novos potenciais biomarcadores são ferramentas de suma importância no diagnóstico (Tabela I. 1), estadiamento e terapêutica, evitando métodos mais invasivos como TRUS na triagem primária, e ainda melhorar a estratificação de risco e a seleção de possíveis candidatos terapêuticos (Ferro et al., 2016; Chistiakov et al., 2018; Kohaar, Petrovics and Srivastava, 2019).

**Tabela I. 1** Genes expressos no cancro da próstata

<b>Gene</b>	<b>Alteração</b>	<b>Ação celular</b>	<b>Referência</b>
<b>DLX1</b>	Regulação positiva	Regulador da transcrição de TGF $\beta$ (progressão do cancro da próstata)	(Ferro <i>et al.</i> , 2016)
<b>STEAP1</b>	Regulação positiva	Aumenta a viabilidade e proliferação Comunicação intercelular	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2013; Gomes <i>et al.</i> , 2018)
<b>MYC</b>	Regulação positiva	Oncogene	(Labbé and Brown, 2018)
<b>ERG</b>	Regulação positiva	Oncogene	(Ferro <i>et al.</i> , 2016)
<b>RASSF1</b>	Mutação ou Deleção	Codifica proteína semelhante a RAS (progressão do cancro da próstata)	(Ferro <i>et al.</i> , 2016)

## 2.4. Tratamento

Atualmente existem diversas opções para o tratamento do CaP, em que a escolha é dependente da categoria de risco em que se enquadra a doença. Por exemplo, temos a terapia de privação de androgénios (ADT) e inibidores do AR, terapia de radiação (RT), prostatectomia radical, terapias ablativas, quimioterapia e imunoterapia. Os pacientes com CaP classificado de baixo risco ou intermediário, elegem frequentemente como opção a vigilância ativa o que evita a morbidade causada por tratamentos desnecessários. Como critérios para a opção de vigilância ativa estão os níveis baixos ou estáveis de PSA, nenhum padrão de Gleason 4 ou 5 e reduzido volume do tumor. Os pacientes podem ainda escolher outras terapias, como a terapia ablativa minimamente invasiva, radioterapia ou prostatectomia. A seleção da terapia é baseada no cenário clínico, onde pode ser utilizada uma terapia isolada ou em combinação (Glass *et al.*, 2012; Evans, 2018). Em homens com cancro localmente ou metastático de alto risco, são frequentemente tratados com radioterapia em associação a terapia hormonal ou somente radioterapia. Os pacientes com doença recorrente ou metastática, sendo resistente ou não à castração, podem receber a quimioterapia e a terapia hormonal (Evans, 2018).

Na área da terapêutica, direcionou-se a busca do prolongamento da vida com o arsenal farmacológico disponível (docetaxel, abiraterona, enzalutamida (ENZA) e apalutamida) (de Wit *et al.*, 2019). O ensaio clínico randomizado STAMPEDE, demonstrou a eficiência na associação entre o antiandrogénio e antineoplásico no tratamento do cancro da próstata metastático, pois os pacientes tratados inicialmente com antiandrogénio e posteriormente com o quimioterápico docetaxel, apresentaram uma melhor sobrevida (3 meses) em relação aos tratados unicamente com mitoxantrona (Berthold *et al.*, 2004;

James et al., 2016). Outro resultado de relevância foi a associação da abiraterona e a hormonoterapia no tratamento do CaP metastático (Fizazi et al., 2017).

Com a evolução das pesquisas surgiram novas opções de tratamento farmacológicos, quer pela utilização de fármacos quimioterápicos quer por antiandrogênicos (hormonoterapia). Na quimioterapia, os principais fármacos utilizados para o tratamento de alguns tipos de CaP, são o docetaxel e cabazitaxel (CBZ). No tratamento do cancro de próstata metastático resistente à castração (mCRPC), o docetaxel é o quimioterápico de primeira escolha, mas em casos que não respondam a este fármaco, utiliza-se como segunda linha de quimioterapia o cabazitaxel por apresentar uma menor resistência (Tsao et al., 2014; Teo, Rathkopf and Kantoff, 2019). Ainda na terapia do mCRPC, pode ser utilizado um antiandrogénio, sendo de primeira escolha a enzalutamida, que veio substituir a utilização da bicalutamida, por desencadear elevada resistência à terapia (Scher et al., 2012; Teo, Rathkopf and Kantoff, 2019).

#### **2.4.1. Cabazitaxel**

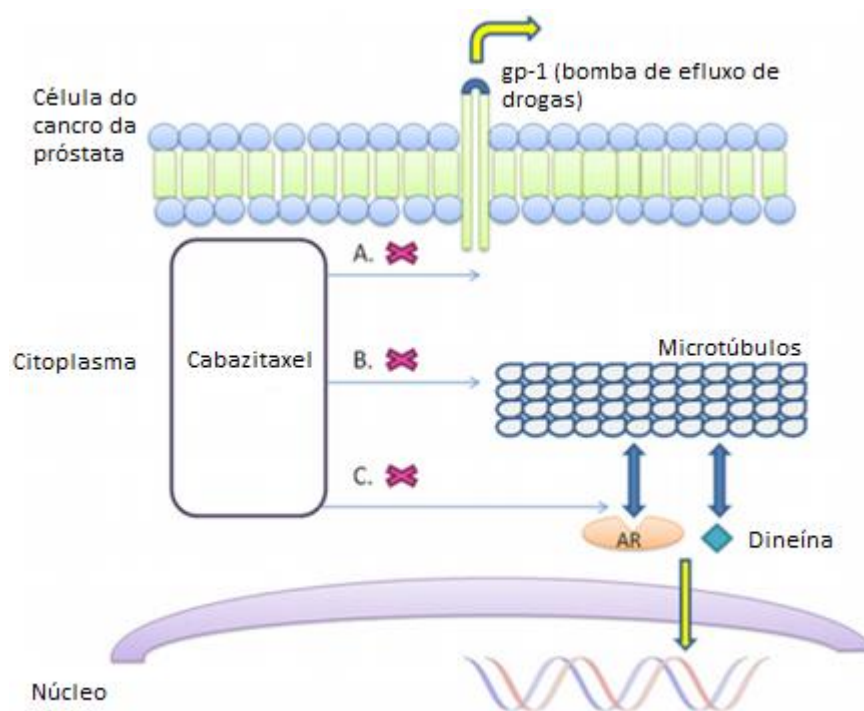
O cabazitaxel é um taxano semissintético, que foi projetado com o intuito de superar a resistência gerada pela glicoproteína-P aos taxanos anteriores, como o docetaxel. Outra vantagem deste taxano é a melhor solubilidade em soluções aquosas. O mecanismo de ação apresenta 3 pontos importantes para a sua eficácia terapêutica (Figura I. 12): i) menor afinidade à glicoproteína-P, possibilitando a acumulação do cabazitaxel no interior da célula; ii) o fármaco liga-se à tubulina dos microtúbulos, promovendo a estabilização e inibindo a sua desmontagem, ou seja, impedindo a divisão celular; iii) a ligação aos microtúbulos e à proteína motora dineína, inibindo a translocação nuclear do AR (Tsao et al., 2014; Patel and Hoffman-Censits, 2017; Komura et al., 2018).

Estudos observaram a efetividade na terapia com cabazitaxel em pacientes que apresentaram progressão da doença em resposta ao tratamento farmacológico com docetaxel, abiraterona e enzalutamida (De Bono et al., 2010; R. J. Van Soest et al., 2015; Robert J. Van Soest et al., 2015).

Existem várias opções farmacológicas no tratamento do mCRPC, mas existem dúvidas sobre a melhor sequência farmacológica para o tratamento, visto que alguns protocolos se iniciam com antineoplásicos e outros com antiandrogênicos. Uma visão generalista centrada no paciente, diz que o curso do tratamento seja baseado nas características individuais do paciente e no comportamento do tumor. Então é frequentemente utilizado

como terapia de segunda linha em pacientes sintomáticos e com altas chances de progressão, após uso do docetaxel. Ainda em outra circunstância, pode ser utilizado como terceira linha, em seguida à segunda linha com abiraterona ou enzalutamida, sempre observando a tolerabilidade clínica do paciente (Al-Mansouri and Gurney, 2019).

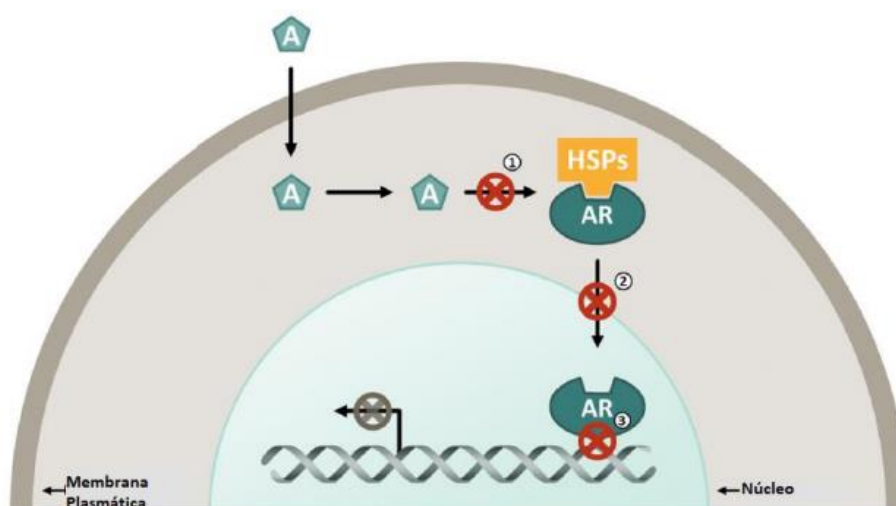
A fim de melhorar a terapêutica com o cabazitaxel no tratamento do mCRPC, tem sido associada à terapia gênica ou silenciamento de genes sobreexpressos no cancro da próstata e associados a mau prognóstico, como em um estudo que avaliou a utilização de um vetor (AdRGD-PGp53) que expressa a p53 autorregulada em associação a terapia com cabazitaxel, observando redução na progressão do tumor e aumento na sobrevivência (Tamura *et al.*, 2020). Outro estudo avaliou o silenciamento do gene/proteína (LEDGF/p75) com a terapia com o cabazitaxel em células quimiorresistente aos taxanos, obtendo uma melhor sensibilidade ao cabazitaxel (Ríos-Colón *et al.*, 2017).



**Figura I. 12** Descrição do mecanismo de ação do cabazitaxel. (A) Menor afinidade a glicoproteína-P. (B) Estabilização dos microtúbulos. (C) Ligação a proteína motora (dineína) (adaptado de (Tsao *et al.*, 2014)).

### 2.4.2. Enzalutamida

Devido ao grande impacto da via de sinalização do AR na progressão do CaP, os antagonistas do AR (enzalutamida, apalutamida e darolutamida) apresentam um papel fundamental no bloqueio do efeito da DHT, diminuindo desta forma a progressão do tumor. A enzalutamida é classificada com antagonista do AR de segunda geração, projetada através do estudo de relação estrutura-atividade, com otimização do tempo de meia-vida, biodisponibilidade, e ainda sendo um potente inibidor (Jung *et al.*, 2010; Schalken and Fitzpatrick, 2016). O mecanismo de ação da enzalutamida pode ser dividido em três etapas distintas (Figura I. 13): i) bloqueio da ligação do androgénio ao AR; ii) inibição da translocação nuclear do AR; e iii) inibição da ligação de AR ao DNA (Saad, 2013; Komura *et al.*, 2018).



**Figura I. 13** Descrição do mecanismo de ação da enzalutamida. (1) Bloqueio da ligação do androgénio ao AR; (2) inibindo a translocação nuclear de AR; (3) inibe a ligação de AR ao DNA (adaptado de (Saad, 2013)).

As primeiras evidências do desempenho farmacológico na terapia do CaP, foi no primeiro ensaio clínico de fase 1 e 2 em homens com CRPC progressivo, independente da quimioterapia anterior. Contudo, era preciso estar dentro de alguns critérios, como PSA sérico crescente na presença de terapia de castração. Este ensaio observou uma redução do PSA sérico de 50% em aproximadamente 56% dos pacientes com resposta em tecidos moles e metástases ósseas com estabilização (Scher *et al.*, 2010).

Ao comparar o desempenho da enzalutamida com a bicalutamida, foi observado no STRIVE Trial uma redução significativa do risco de progressão e morte em pacientes com CRPC ou mCRPC, quando tratados com enzalutamida, por superar as limitações da bicalutamida, como maior afinidade (10 vezes) ao AR e com a resistência encontrada na terapia com bicalutamida, devido à sobreexpressão do AR e à atividade como agonista

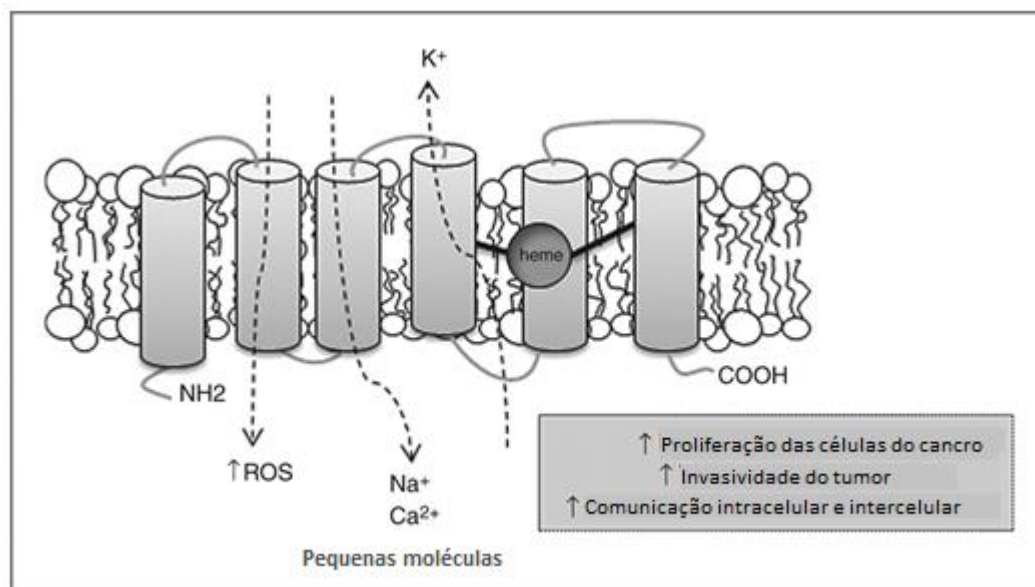
parcial (Penson *et al.*, 2016). Ensaios clínicos de fase 3, observaram que o tratamento com enzalutamida, antes ou após a terapia com docetaxel, resultou num aumento da sobrevida global (Scher *et al.*, 2012; Shtivelman, Beer and Evans, 2014). Um ponto em comum descrito em alguns estudos sobre o CaP, é o aumento da sobrevida global, obtido através do tratamento com enzalutamida (Beer *et al.*, 2017; de Wit *et al.*, 2019; Sternberg *et al.*, 2020).

Com intuito de melhorar a ação da enzalutamida no tratamento do CRPC, alguns estudos têm explorado a sua ação combinada com o silenciamento de genes sobreexpressos no cancro da próstata associados a mau prognóstico. Num estudo realizado com células LNCaP resistentes à enzalutamida, foi observado que a combinação do silenciamento do gene do fator 1-alfa induzível de hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) com a enzalutamida, aumentava sinergicamente a atividade da enzalutamida, e deste modo, reduzia a proliferação celular (Fernandez *et al.*, 2015).

## **2.5. Six transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 1**

A “Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate” 1 (STEAP1), pertence à família STEAP, onde foram identificados posteriormente outros membros (STEAP2, STEAP3 e STEAP4). O gene *STEAP1* está localizado no cromossomo 7q21.13, originando dois transcritos (1,4 kb e 4,0 kb), onde apenas o transcrito 1,4 kb origina uma proteína com 339 aminoácidos, apresentando dois domínios terminais (–COOH e –NH<sub>2</sub>) na região citoplasmática, três domínios extracelulares e um sítio de ligação intramembrana com o heme (Figura I. 14). A STEAP1 foi identificada pela primeira vez como um antigénio de superfície celular em cancro da próstata metastático avançado (Hubert *et al.*, 1999).

É uma proteína transmembranar, expressa nas células epiteliais, e que está localizada predominantemente nas junções célula-célula. Em tecidos normais, a expressão da STEAP1 é quase limitada à próstata, apesar de ser expressa em baixos níveis noutros órgãos, como por exemplo na bexiga, fígado, rim, pâncreas e músculo esquelético (Hubert *et al.*, 1999; Grunewald, Ranft, *et al.*, 2012; Moreaux *et al.*, 2012; Nakamura *et al.*, 2019). Relativamente à expressão da STEAP1 no cancro, é sobreexpressa não apenas no cancro da próstata, mas também noutros tipos de cancro, incluindo a mama, pulmão, bexiga, cólon, ovário e tumores de Ewing (Hubert *et al.*, 1999; Maia *et al.*, 2008; Grunewald, Ranft, *et al.*, 2012; Moreaux *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2014, 2018; Nakamura *et al.*, 2019).



**Figura I. 14** Estrutura prevista da STEAP1 e algumas das suas funções (adaptado de (Gomes, Maia and Santos, 2012)).

Considerando a sua estrutura e localização na membrana plasmática, foi proposto que pode atuar como um transportador e/ou canal iónico (Figura I. 14) de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , também de pequenas moléculas e ainda por estar envolvido na comunicação intercelular (Smith *et al.*, 1998; Challita-Eid *et al.*, 2007). Foi observado que a maior expressão da STEAP1 está associada a um aumento no crescimento tumoral *in vitro* quando comparado células silenciadas para o gene *STEAP1* (Gomes *et al.*, 2018).

### 2.5.1. Funções e regulação da expressão da STEAP1

Algumas linhas de pesquisas envolvem a regulação da expressão da STEAP1, através da utilização de ácido zoledrónico e  $17\beta$ -estradiol, inibindo respetivamente a expressão do mRNA de STEAP1 em células do CaP e mama (Maia *et al.*, 2008; Valenti *et al.*, 2010). Outro mecanismo envolvendo a STEAP1 é a resposta ao estresse oxidativo e o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigénio (ROS), regulando genes sensíveis a redox e ativando o perfil pró-invasivo no cancro de Ewing, direcionando para uma função oncogénica (Grunewald, Diebold, *et al.*, 2012). Esses dados reforçam a STEAP1 como alvo terapêutico no CaP, incentivando o desenvolvimento de terapias associadas ao silenciamento da STEAP1 (Barroca-Ferreira *et al.*, 2017).

### **2.5.2. O papel da STEAP1 como biomarcador**

Atualmente é mais estudado o envolvimento da STEAP1 como possível biomarcador de prognóstico em alguns tipos de cânceros. Estudos científicos associam a regulação positiva da STEAP1 à um mau prognóstico, como no carcinoma do endométrio, em PIN, câncer da mama e adenocarcinoma do pulmão (Gomes et al., 2014; Sun et al., 2019; Xie et al., 2019; Rebai et al., 2020). Outros estudos procuraram identificar a influência do silenciamento da STEAP1, observando em LNCaP e no tumor de Ewing uma inibição da proliferação, expansão clonal e invasão (Grunewald, Ranft, et al., 2012; Gomes et al., 2018). Assim, esses dados demonstram que a sobreexpressão da STEAP1 está associada a um perfil mais agressivo, sugerindo uma potencial utilidade como biomarcador.

## II. Objetivos

A STEAP1 é descrita como um potencial biomarcador e/ou alvo terapêutico, visto ser sobreexpressa em diversos tipos de cânceros, apresentar uma expressão reduzida ou mesmo inexistente em células normais, e ser uma proteína transmembranar com ações oncogênicas. Na prática clínica, alguns protocolos utilizam amplamente os fármacos cabazitaxel e enzalutamida como tratamento farmacológico do câncer da próstata, em que um dos obstáculos à terapêutica é a resistência desenvolvida por parte dos pacientes com câncer da próstata. Por isso, é importante estudar terapias combinadas para melhorar a eficácia e/ou diminuir a resistência desenvolvida pelos pacientes aos fármacos. Para além disso, esta abordagem pode também identificar biomarcadores que indiquem se os pacientes vão beneficiar ou não da terapêutica.

O presente estudo tem como principal objetivo avaliar se as células tumorais se tornam mais sensíveis ao tratamento com cabazitaxel ou enzalutamida, quando silenciadas para o gene *STEAP1*, assim como avaliar se a sobreexpressão da STEAP1 pode ser utilizada como um biomarcador preditivo em resposta ao tratamento. Para alcançar estas metas, os seguintes sub-objetivos foram delineados:

1. Determinação da curva dose-resposta para o cabazitaxel e enzalutamida em células LNCaP;
2. Efeito do cabazitaxel e enzalutamida na expressão da STEAP1 em células LNCaP;
3. Avaliar a viabilidade celular/proliferação, apoptose e adesão celular de células LNCaP em resposta ao tratamento com o cabazitaxel ou enzalutamida, com ou sem silenciamento do gene *STEAP1*.

### **III. Materiais e métodos**

#### **1. Cultura Celular**

A linha celular de cancro da próstata (LNCaP) foi obtida de adenocarcinoma da próstata ou metástase cerebral, sendo sensível a androgénios. Foi adquirida à European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) e mantida em meio RPMI-1640 com phenol-red (Sigma Aldrich, USA) suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10% (Biochrom AG, Germany) e penicilina/estreptomicina a 1% (Gibco, Life technologies, USA), numa incubadora humidificada a 37 °C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **2. Desenho Experimental e Tratamento**

##### **2.1. Ensaio de Sensibilidade a Fármacos**

A metade da concentração efetiva máxima (EC<sub>50</sub>) foi determinada pelo ensaio MTT (Sigma Aldrich). Aproximadamente  $2,5 \times 10^4$  células, foram semeadas numa placa de 96 poços. Após 24 horas de cultura, as células LNCaP a uma confluência de 50%, foram tratadas com diferentes concentrações (1; 5; 10; 25; 50; 100; 1000 nM) de cabazitaxel (Sigma Aldrich) e enzalutamida (Sigma Aldrich) durante 24h. Depois deste tempo, foi realizado o ensaio de MTT.

O ensaio de MTT avalia a viabilidade celular, onde é medida a capacidade enzimática (enzima mitocondrial succinato desidrogenase) das células metabolicamente ativas em converter uma substância solúvel em água de cor amarela (sal tetrazólio), em uma substância insolúvel em água de cor violeta (cristais de formazan) que se acumulam no citoplasma das células, sendo posteriormente solúvel em DMSO, gerando uma solução de coloração violeta, onde a intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (Wang *et al.*, 2010).

Resumidamente, após os tratamentos, 100 µL da solução de MTT (0.5 mg/µL) foram adicionados às células, incubando a placa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> durante 1h. Em seguida foi removida a solução de MTT e adicionado 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A leitura da placa foi feita num espectrofotómetro de microplaca (BIO-RAD xMark) a um comprimento de onda de 570 nm.

## **2.2. Silenciamento do Gene *STEAP1* e Tratamento com Cabazitaxel (CBZ) e Enzalutamida (ENZA)**

As células LNCaP foram cultivadas em frascos pequenos (25cm<sup>2</sup>) a uma densidade celular de 0,8x10<sup>6</sup> células/frasco. Após atingirem uma confluência de 50%, foram definidas as seguintes condições experimentais: i) scramble siRNA; ii) STEAP1 siRNA; iii) scramble siRNA + CBZ; iv) scramble siRNA + ENZA; v) STEAP1 siRNA + CBZ; vi) STEAP1 siRNA + ENZA. Para o controlo do silenciamento, usou-se 20 nM de uma sequência de RNA de interferência aleatória (scramble siRNA, LTAB 4390846, Ambion). Para o silenciamento do STEAP1 usou-se 20 nM de uma pool de siRNAs específicos (Ref. s4392421, Ambion). A transfecção foi feita com lipofectamina 3000 (Invitrogen, USA) em Opti-MEM (Invitrogen, USA), conforme recomendado pelo fabricante. Após 24h da transfecção, as células foram tratadas com cabazitaxel e enzalutamida durante 24h. No final do ensaio, as células foram recolhidas para as extrações do RNA e proteína total.

## **3. Extração de RNA Total e qPCR**

A extração do RNA total das células foi realizada com a utilização do reagente TRI (Grisp, Portugal), conforme as orientações do fabricante. O pellet de RNA foi solubilizado em 20 µL de água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenado a -80°C. A quantificação e pureza do RNA total foi efetuada num nano-espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000, Denmark) através da determinação da absorvância a 260 e 280 nm. Posteriormente, foi avaliada a integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose.

A reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi utilizada para determinar os níveis de expressão do mRNA do STEAP1 e p21 usando o kit Power SYBR Green RNA-to-CT, 1-Step (Applied Biosystems, USA) no sistema CFX connect real-time (Bio-Rad, Hercules, EUA). Para a reação foi adicionado 0,2 µL de RNA em 10 µL de reação total com 300 nM dos primers específicos para STEAP1 (sense: 5' GGC GAT CCT ACA GAT ACA AGT TGC 3' e anti-sense: 5' CCA ATC CCA CAA TTC CCA GAG AC 3'), p21 (sense: 5' GTT CCT TGC CAC TTC TTA C 3' e anti-sense: 5' ACT GCT TCA CTG TCA TCC 3') e para o housekeeping beta-2-microglobulin (β2M, sense: 5' ATG AGT ATG CCT GCC GTG TG 3' e anti-sense: 5' CAA ACC TCC ATG ATG CTG CTTAC 3'). A reação iniciou-se com a transcrição reversa a 50°C durante 30 min. Depois a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo

real com uma desnaturação a 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos com as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 30 s, temperatura de annealing a 60°C por 30 s e polimerização a 72°C por 20 s. A especificidade dos fragmentos de PCR amplificados foram analisados através das curvas de melting. Para normalizar a expressão do gene *STEAP1* e *p21*, utilizou-se a expressão do gene housekeeping  $\beta$ 2M. As diferenças de expressão foram calculadas seguindo o modelo matemático proposto por Pfaffl  $ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target(control-sample)}}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref(control-sample)}}}$  (Pfaffl, 2001).

#### 4. Extração de Proteína Total e Western Blot

Para a extração da proteína total das células LNCaP, utilizou-se o ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA), constituído por 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 0.5% desoxilato de sódio, 0.1% dedocil sulfato de sódio (SDS) e 50 mM Tris, suplementado com 10% de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 1% de uma mistura de inibidores de proteases. O extrato de proteína total foi obtido após centrifugação do lisado celular durante 20 min a 14.000 rpm a 4°C. Para quantificar a proteína total, foi utilizado o reagente de ensaio de proteína (Pierce) (Thermo Scientific, USA). A fim de determinar os níveis de expressão da *STEAP1*, e outras proteínas, usou-se aproximadamente 20 µg de proteína total. As proteínas foram separadas de acordo com seu peso molecular em gel de poliacrilamida TGX Stain-Free a 10% (Bio-Rad, USA) e em seguida foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (Bio-Rad, USA), sendo feito de seguida o bloqueio com solução de leite a 5% para posterior incubação (overnight a 4°C) com os seguintes anticorpos: rabbit anti-*STEAP1* (1:1000, ref. D8B2V, Cell Signaling Technology), rabbit anti-p53 (1:1000, ref. sc-6243, Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-E-caderina (1:1000, ref. sc-8426, Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-p-c-Myc (1:1000, ref. #13748, Cell Signaling Technology), rabbit anti-Bcl-2 (1:1000, ref. #2876, Cell Signaling Technology) e rabbit anti-Bax (1:1000, ref. #2772, Cell Signaling Technology). Com a conjugação subsequente aos anticorpos secundários anti-mouse (1:1000, ref. sc-2005, Santa Cruz Biotechnology) ou anti-rabbit (1:1000, ref. sc-2004, Santa Cruz Biotechnology). A imunorreatividade foi visualizada usando o ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad), após a reação com o substrato ECL (Bio-Rad, USA). A quantificação dos níveis de expressão das proteínas, foi determinada através da análise da densitometria utilizando o software Image Lab 5.1 (Bio-Rad). A normalização foi realizada com gel de poliacrilamida TGX Stain-Free a 10% (Bio-Rad, USA).

## **5. Ensaio de Atividade de Caspase-3**

A análise da atividade da enzima caspase-3 foi determinada pela clivagem do substrato marcado pela detecção do cromóforo p-nitroanilina (pNA), medida espectrofotometricamente a 405 nm. Para a reação, aplicou-se 20 µg de extrato de proteína total, incubadas com um tampão de reação (20 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% CHAPS, 10% 2 mM EDTA, suplementado com 10 mM de DTT) e 2 mM de substrato da caspase-3 (Ac-DEVD-pNA) durante 2h a 37 °C. A quantificação de pNA gerado foi calculado por extrapolação com uma curva padrão com quantidades conhecidas de pNA.

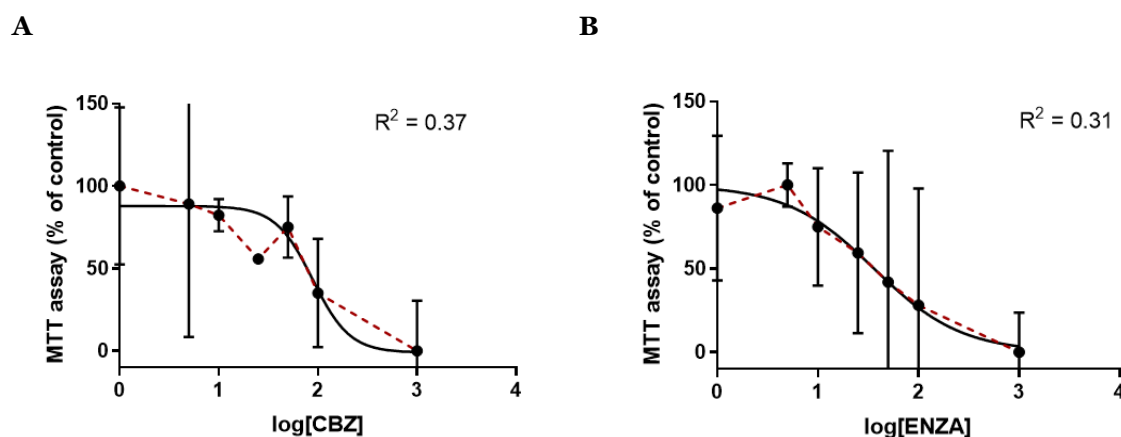
## **6. Análise Estatística**

Os dados experimentais são apresentados através da média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). Na análise da significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais, aplicou-se o unpaired t-test ou one-way ANOVA, seguidamente do Sidak's multiple comparisons test. A análise foi realizada utilizando o GraphPad Prism v8.00 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## IV. Resultados e Discussão

### 1. Determinação do EC<sub>50</sub> do Cabazitaxel e Enzalutamida

Com intuito de determinar a EC<sub>50</sub> para o cabazitaxel e enzalutamida, foi determinada a viabilidade de células LNCaP expostas a diferentes concentrações (1; 5; 10; 25; 50; 100; 1000 nM) de fármaco, durante 24 h. Este ensaio foi realizado em hexaplicado para cada concentração, sendo replicado em quatro experiências independentes. Os resultados obtidos pelo modelo de regressão linear, estão descritos na figura IV. 1. A determinação da EC<sub>50</sub> para o cabazitaxel (CBZ) e a enzalutamida (ENZA) não foi obtida com sucesso, devido a uma elevada variabilidade de valores em resposta às concentrações utilizadas. Ao comparar os dois fármacos, podemos constatar que as células tratadas com enzalutamida apresentaram maiores desvios na viabilidade celular quando comparadas com as tratadas com cabazitaxel.



**Figura IV. 1** Determinação de EC<sub>50</sub> para cabazitaxel (CBZ, n = 4, A) e enzalutamida (ENZA, n = 4, B). às 24h (A, B).

Um estudo recente mostrou que a ação citotóxica do cabazitaxel em células LNCaP pode ser atrasada pelo efeito dos androgénios, e observaram um aumento da citotoxicidade com a utilização prévia de terapia de privação de androgénio, como antiandrogénicos (Begemann *et al.*, 2020). Este estudo poderá justificar a variação na viabilidade celular com o cabazitaxel, uma vez que o soro usado apresenta níveis de androgénios. Relativamente à enzalutamida, não encontramos resultados científicos que justifiquem a variabilidade na viabilidade das células LNCaP.

Para dar continuidade ao trabalho e atingir os objetivos deste estudo, foi realizada uma revisão bibliográfica no sentido de selecionar uma concentração de cabazitaxel e enzalutamida que já tivesse sido usada em células LNCaP. Assim, foi selecionada a concentração 1 nM para o cabazitaxel (Rottach *et al.*, 2019) e 10  $\mu$ M para a enzalutamida (Rottach *et al.*, 2019; Kandil *et al.*, 2021).

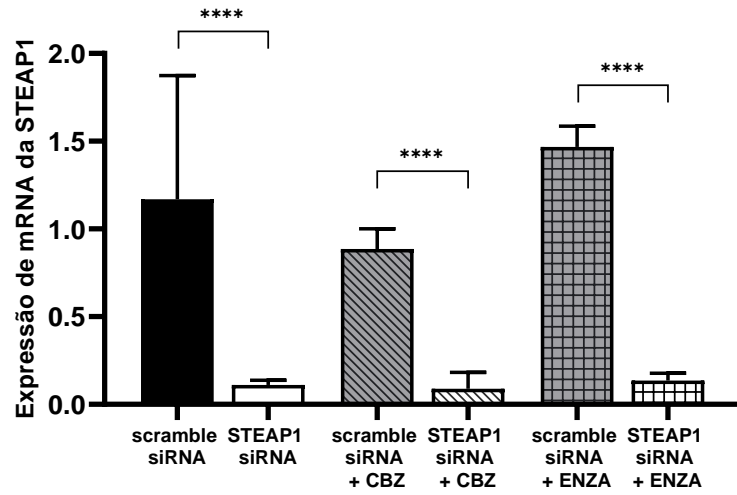
## **2. Efeito da terapia com Cabazitaxel ou Enzalutamida, associada ao silenciamento da STEAP1**

A influência da STEAP1 no tratamento do cancro da próstata com os fármacos cabazitaxel e enzalutamida foi avaliada recorrendo ao silenciamento do gene, determinando os seus efeitos na viabilidade/proliferação celular, apoptose e adesão celular.

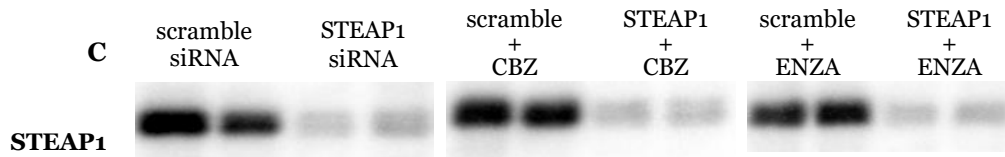
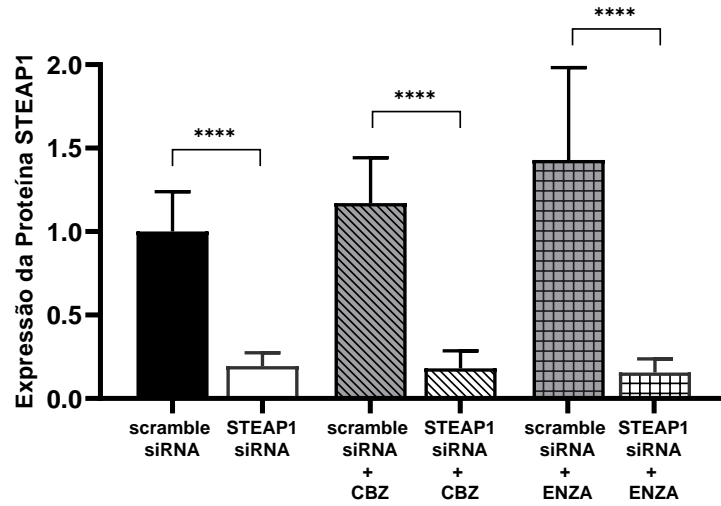
### **2.1. Análise da expressão da STEAP1**

Para avaliarmos se a expressão da STEAP1 afeta o tratamento com cabazitaxel ou enzalutamida em células LNCaP, foi realizado o silenciamento do gene *STEAP1*. Como primeira abordagem foi analisado a expressão do mRNA e proteína STEAP1. Conforme pode ser observado na figura IV. 2, o silenciamento do gene *STEAP1* foi realizado com êxito, obtendo uma redução significativa de 89% ( $117\% \pm 0.70$  vs  $11\% \pm 0.03$ ) de mRNA e 81% ( $100\% \pm 0.24$  vs  $19,4\% \pm 0.08$ ) de proteína STEAP1 em relação ao grupo scramble siRNA (controlo). Este resultado está de acordo com o descrito previamente pelo nosso grupo de investigação (Gomes *et al.*, 2018). Analisando a diminuição da expressão do mRNA de STEAP1 (figura IV.2 A), observamos que não houve diferença significativa quando associado o silenciamento (STEAP1 siRNA) ao tratamento com enzalutamida ou cabazitaxel.

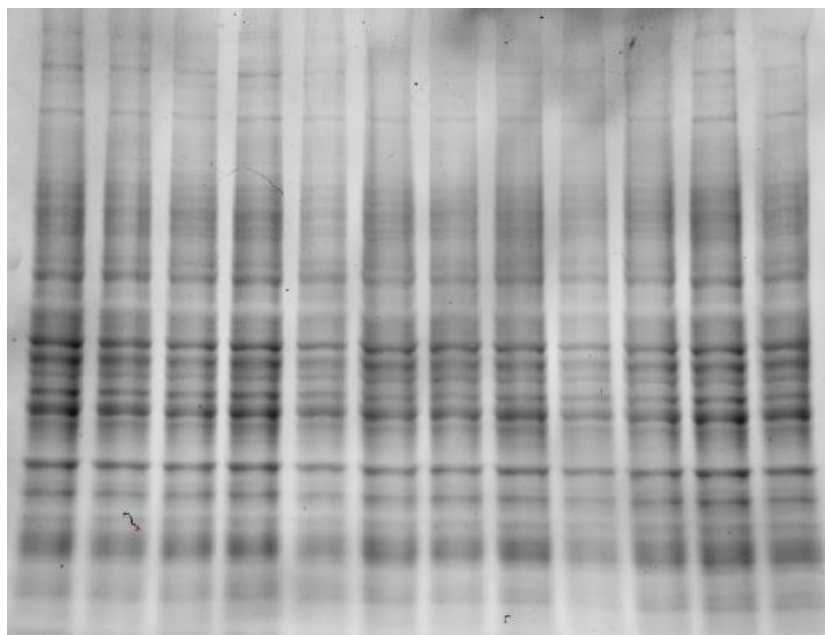
A



B



D

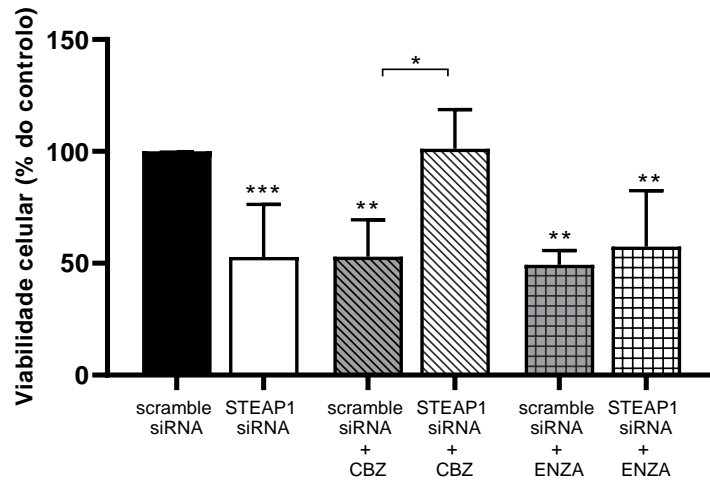


**Figura IV. 2** Efeito do silenciamento do gene *STEAP1* em células LNCaP, associado a terapia com cabazitaxel (CBZ) e enzalutamida (ENZA). A expressão do mRNA foi determinada por qPCR (A), normalizado com gene  $\beta 2M$ . A expressão da proteína foi determinada por Western Blot (B). Em (C) está representado o immunoblot de STEAP1, normalizando com o gel (D). Os resultados são expressos como variação relativas ao grupo controlo (scramble siRNA). As barras de erro indicam a média  $\pm$  SEM (n=2), \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001.

## 2.2. Avaliação da viabilidade e proliferação celular

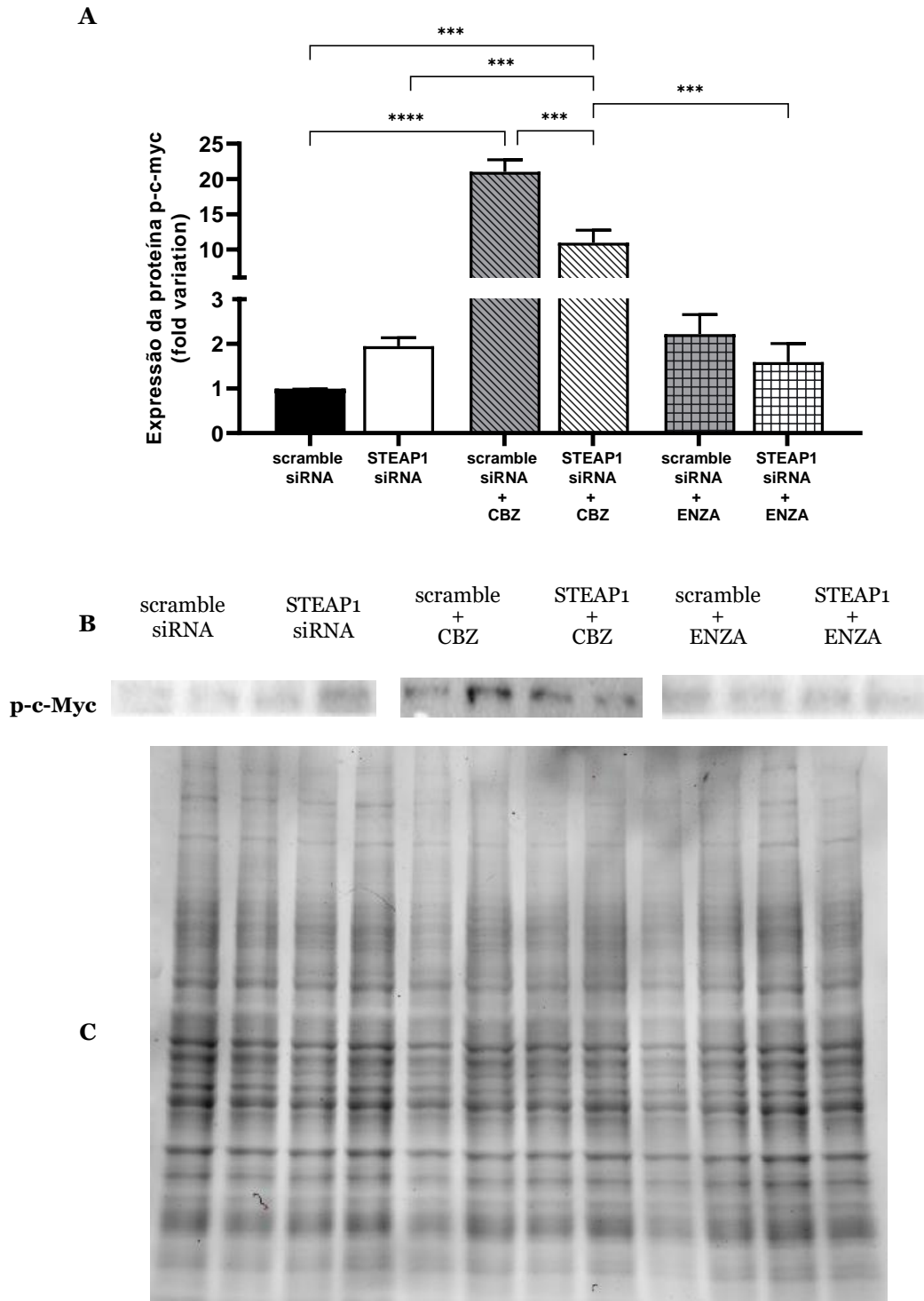
A viabilidade das células LNCaP foi avaliada pelo ensaio de MTT, após o tratamento com cabazitaxel e enzalutamida, permitindo assim determinar a influência do gene *STEAP1* na terapêutica. Realizando uma análise dos resultados obtidos (Figura IV. 3), podemos observar que o silenciamento levou a uma redução significativa de, aproximadamente, 47% da viabilidade no grupo *STEAP1* siRNA em comparação ao scramble siRNA. Este resultado coincide com resultados obtidos em outros estudos, em que o silenciamento da *STEAP1* resultou na diminuição da viabilidade em linha celulares do cancro da próstata, gástrico e hepático (Gomes *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018; Iijima *et al.*, 2021). No entanto, o tratamento com cabazitaxel reverte a diminuição da viabilidade induzida pelo silenciamento do gene *STEAP1*, aumentando aproximadamente 48% (53% vs 101%). Resultado semelhante foi observado em um estudo realizado anteriormente em nosso grupo de investigação com o quimioterápico docetaxel, onde houve um aumento de 25% na viabilidade celular com silenciamento da *STEAP1* (Cardoso, 2020). Contudo, um estudo realizado com uma linha celular do cancro gástrico (MKN45), foi constatado que o silenciamento da *STEAP1* potencializou a quimiossensibilidade ao docetaxel (Wu *et al.*,

2018). Quando as células foram tratadas com a enzalutamida não foi observada diferença significativa com a ausência ou presença da STEAP1 (49% vs 57%), semelhante ao encontrado anteriormente com o antiandrogénio bicalutamida (48% vs 51%) (Cardoso, 2020).



**Figura IV. 3** Análise da viabilidade celular pelo ensaio MTT. Células LNCaP silenciadas ou não para o gene *STEAP1* foram expostas ao cabazitaxel (CBZ) e à enzalutamida (ENZA). Os resultados são descritos em percentagem (%) em relação ao grupo controlo (scramble siRNA). As barras de erro indicam a média  $\pm$  SEM (n=4) \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001.

Com intuito de explorar a influencia do gene *STEAP1* na proliferação celular, analisou-se, por western blot, a expressão da proteína c-Myc na sua forma ativa que é fosforilada (p-c-Myc). Como o c-Myc é um fator de transcrição frequentemente sobreexpresso em adenocarcinoma prostático, é considerado um impulsor da proliferação celular e progressão do ciclo celular.



**Figura IV. 4** Efeito do silenciamento do gene *STEAP1* na proliferação. Células LNCaP silenciadas ou não para o gene *STEAP1* foram expostas a cabazitaxel (CBZ) e a enzalutamida (ENZA). A expressão da proteína p-c-Myc foi determinada por Western Blot (A), normalizando com o gel. Os resultados são expressos como variação relativa ao grupo controlo (scramble siRNA). Em (B) está representado o immunoblot de p-c-Myc. As barras de erro indicam a média  $\pm$  SEM (n=2), \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Analisando a ação da STEAP1 na expressão de p-c-Myc (figura IV.4), é notável uma inclinação ao aumento na expressão de p-c-Myc em células silenciadas (STEAP1), comparativamente ao controlo - scramble ( $100\% \pm 0.001$  vs  $195\% \pm 0.133$ ). Esse aumento na expressão de p-c-Myc em células silenciadas, possivelmente deve-se a um mecanismo molecular para contrapor a diminuição da proliferação em resposta ao silenciamento da STEAP1. Associando à terapêutica com os fármacos, verificou-se que o silenciamento da STEAP1 resultou em uma diminuição significativa da expressão de p-c-Myc quando associada ao tratamento com cabazitaxel ( $21\% \pm 1.2$  vs  $11\% \pm 1.3$ ). Embora sem significado estatístico, também é possível observar uma tendência de diminuição na expressão de p-c-Myc associada à terapia com enzalutamida ( $2.2\% \pm 0.3$  vs  $1.6\% \pm 0.3$ ).

Num estudo realizado em linha celulares de hepatocarcinoma (HepG2 e Hep3B), foi notada uma regulação negativa de c-Myc quando as células foram transfectadas com siRNA direcionado ao silenciamento da STEAP1 (Iijima *et al.*, 2021). Reforçando que a sobreexpressão da STEAP1, favorece o aumento da proliferação celular (Gomes *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020; Iijima *et al.*, 2021), migração e invasão celular (Wu *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2019; Huo *et al.*, 2020; Jiao *et al.*, 2020), e ainda é associada ao aumento no grau de Gleason (Ihlaseh-Catalano *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2014).

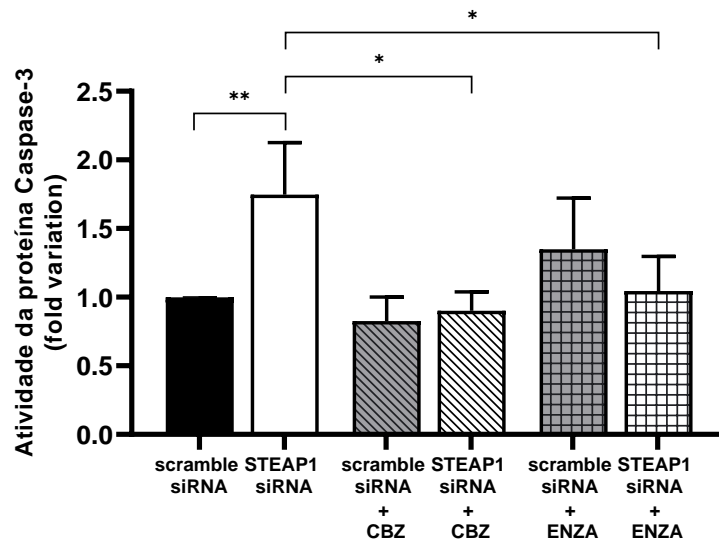
Alguns estudos evidenciam que a sobreexpressão de STEAP1 promove a progressão do cancro da próstata (Ihlaseh-Catalano *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2014). Sendo também observado a sobreexpressão da proteína nuclear c-Myc em 97% dos cancros da próstata, correlacionando com aumento da proliferação e a diminuição da apoptose (Sato *et al.*, 2006; Gurel *et al.*, 2008; Hawksworth *et al.*, 2010; Pettersson *et al.*, 2018).

Alguns estudos têm descrito, no CaP, mecanismos que permitem a estabilização da proteína c-Myc e, assim, evitar a sua degradação via proteassoma pela ubiquitinação. A estabilização ocorre através da fosforilação de c-Myc na serina 62 (pS62) ao invés da treonina 58 (pT58) que encaminharia para a degradação (Junttila and Westermarck, 2008; Wu *et al.*, 2019). Devido a uma alteração estrutural de c-Myc, na treonina 58, e isto favorece a fosforilação na serina 62 e conduz a estabilização. Este mecanismo de estabilização de c-Myc tem sido relacionado com a desregulação de duas vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e ERK/RAS, uma vez que, para ocorrer a degradação de c-Myc, é necessária uma fosforilação inicial em serina 62 (pS62) mediada ERK e, seguidamente, de uma fosforilação na treonina 58 por GSK-3 (Sears *et al.*, 2000; Junttila and Westermarck, 2008; Wu *et al.*, 2019). Então, podemos justificar o resultado encontrado, pois uma maior estabilidade da forma (p-c-Myc (pS62)) contribui para a sobreexpressão, principalmente associado à terapêutica com cabazitaxel.

Outra explicação para a sobreexpressão de c-Myc nas células tratadas com cabazitaxel, ocorre pela regulação negativa do recetor de androgénio, visto que um dos mecanismos de ação do cabazitaxel é impedir a translocação do AR para o núcleo. Evidências apontam que c-Myc antagoniza atividade transcricional do AR, pois antagoniza a produção transcricional de genes alvos de AR, assim observou-se em amostras clínicas que apresentavam programas transcricionais simultâneos de AR baixo e de c-Myc alto, contribuiria para a progressão do cancro e ainda direcionava a doença metastática resistente a castração (Barfeld *et al.*, 2017; Qiu *et al.*, 2021).

### **2.3. Avaliação da apoptose**

Para determinar a influência do gene *STEAP1* nas vias apoptóticas, foi analisada a atividade da enzima caspase 3 e os níveis de expressão de proteínas reguladoras da apoptose, como p53, p21, Bax e Bcl-2. A avaliação da apoptose através do ensaio da atividade da caspase 3 é importante, visto que as vias intrínsecas e extrínsecas convergem para ativação da caspase 3, uma enzima efectora da apoptose, sendo considerada o ponto irreversível da apoptose. Analisando os resultados expressos na Figura IV. 5, podemos constatar que a atividade da caspase 3 aumentou significativamente ( $p < 0,01$ ) com silenciamento da *STEAP1*, conforme constatado em estudos anteriores do nosso grupo (Gomes *et al.*, 2018; Cardoso, 2020). Mas quando associado a terapia farmacológica com o cabazitaxel ou a enzalutamida, ocorreu uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade da caspase 3.

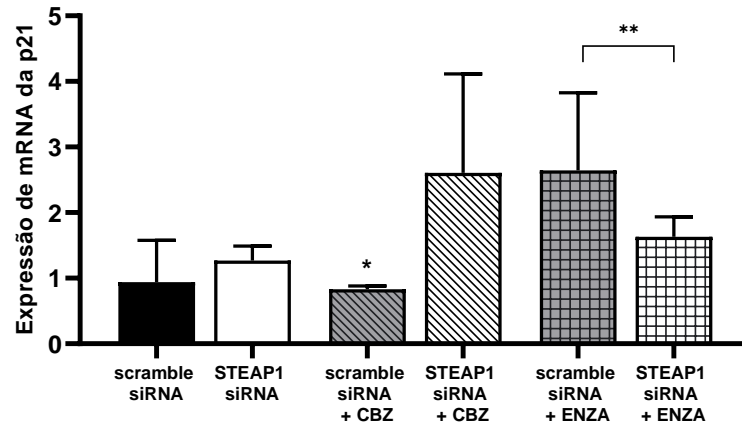


**Figura IV. 5** Avaliação do nível de expressão da caspase 3 em células LNCaP silenciadas para o STEAP1 e expostas a cabazitaxel (CBZ) e enzalutamida (ENZA). Os Resultados são expressos em % relativamente ao controlo (scramble siRNA). As barras de erro indicam a média  $\pm$  SEM (n=2), \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

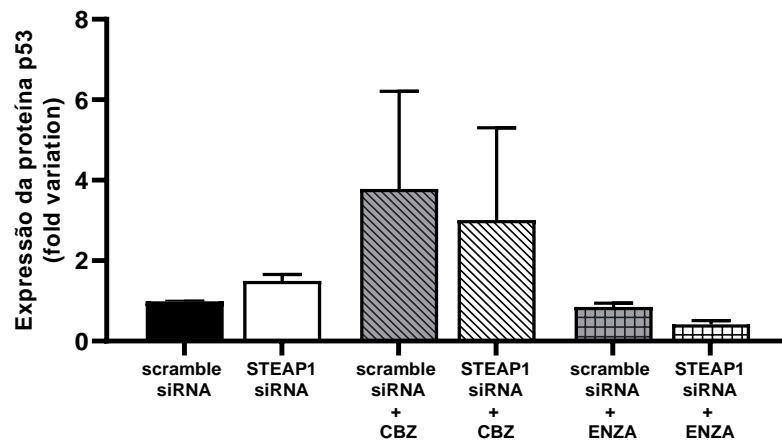
A fim de complementar a avaliação da resposta apoptótica e o ciclo celular, análise da expressão de mRNA, do p21 e proteína p53 foi feita em células LNCaP silenciadas para o STEAP1 e expostas aos dois fármacos em estudo. A proteína p53 desempenha um papel importante como supressor de tumor e pela sua ação pró-apoptótica. Avaliando a expressão de mRNA do p21 (figura IV. 6 A), não observamos aumento da expressão com o silenciamento da STEAP1 (STEAP1 siRNA) em relação ao controlo (scramble siRNA), conforme foi observado anteriormente (Gomes *et al.*, 2018). Um panorama distinto foi encontrado quando associamos o silenciamento do gene *STEAP1* a terapêutica com o cabazitaxel e a enzalutamida, pois com silenciamento e a terapia com o cabazitaxel ocorreu um aumento da expressão do mRNA da p21, embora possa ser observado um grande desvio. Todavia na terapia com enzalutamida observamos o inverso, pois houve uma diminuição significativa (p < 0,01) na expressão de mRNA do p21 na condição silenciada (STEAP1 siRNA) quando comparada a não silenciada (scramble siRNA). Analisando a expressão da proteína p53 (figura IV. 6B), podemos observar que não houve diferença significativa com o silenciamento da STEAP1 ou quando associado as terapias com cabazitaxel e enzalutamida. A expressão de c-Myc tem sido associada a uma regulação negativa da transcrição do p21, e assim superar a paragem do ciclo celular, promovendo a proliferação (Claassen and Hann, 2000; Gartel *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007). Num estudo realizado em células de leucemia K562, foi observado que o c-Myc antagoniza os efeitos de p53 e p21 (Ceballos *et al.*,

2000). Assim, esses estudos justificam a variabilidade encontrado na expressão de p21 e p53, principalmente associada a terapêutica com cabazitaxel e a enzalutamida, ocasionando um aumento na expressão de c-Myc como mecanismo de sobrevivência. Desta forma, dificultando observar a influência da indução de STEAP1 e os fármacos na expressão de p53 e p21, gerando uma variabilidade no resultado de expressão.

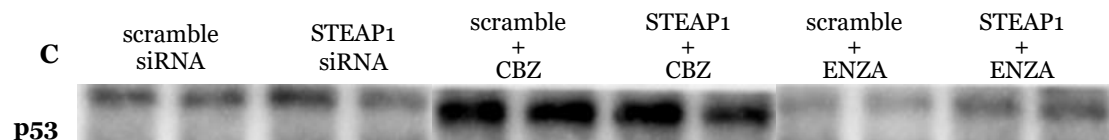
A



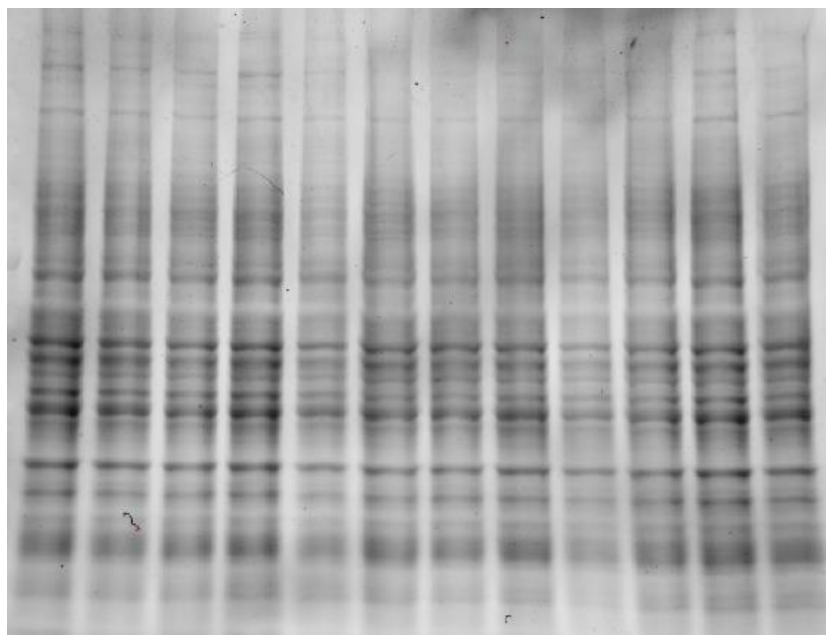
B



C

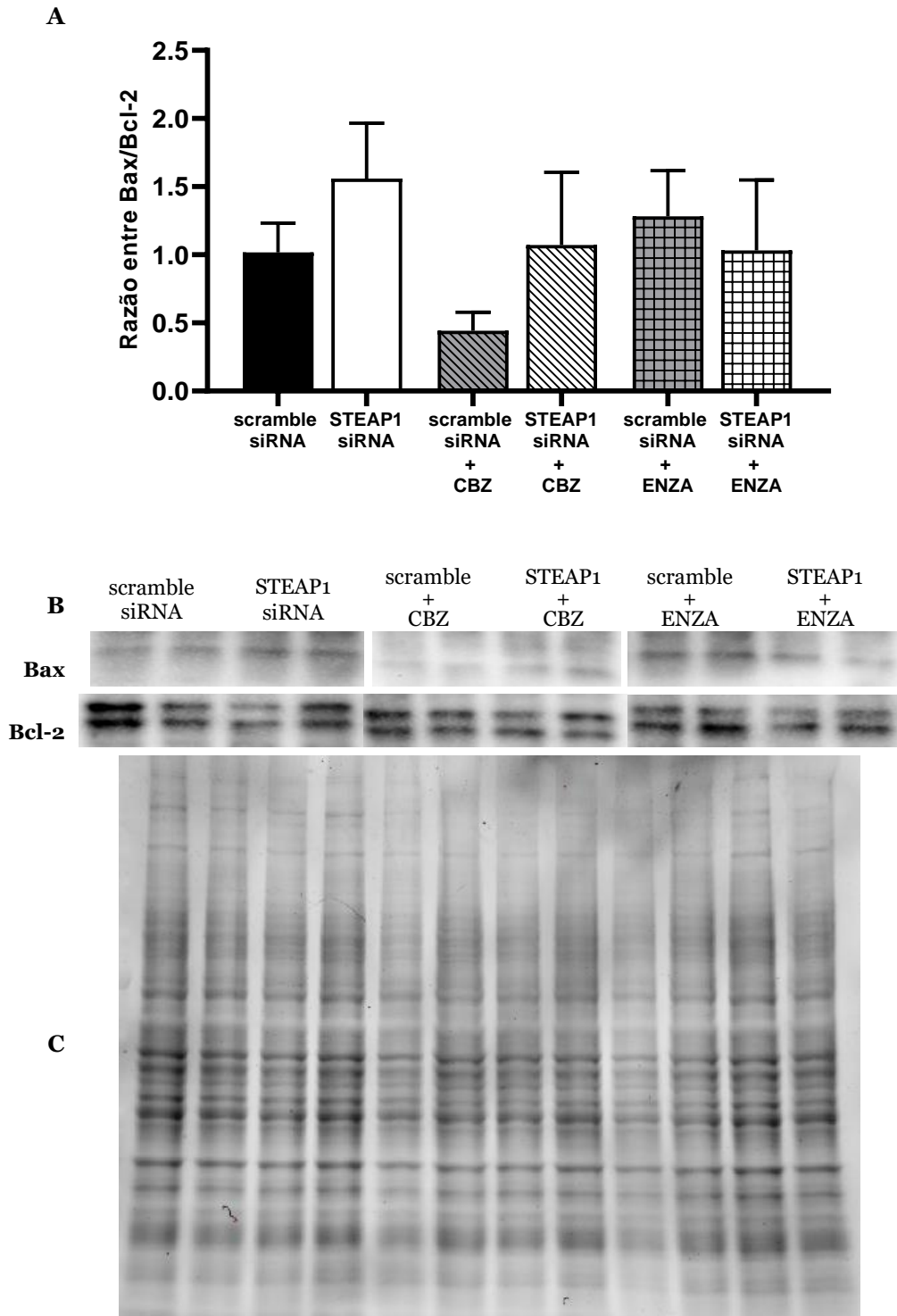


D



**Figura IV. 6** Efeito do silenciamento do gene *STEAP1* nos níveis de expressão dos reguladores do ciclo celular p21 e p53. A expressão de mRNA do p21 foi determinada por qPCR (A), normalizado com gene  $\beta 2M$ . A expressão da proteína p53 foi determinada por Western Blot (B). Em (C) está representado o immunoblot de *STEAP1*, normalizando com o gel (D). Os resultados são expressos como variação relativas ao grupo controle (scramble siRNA). As barras de erro indicam a média  $\pm$  SEM, \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001.

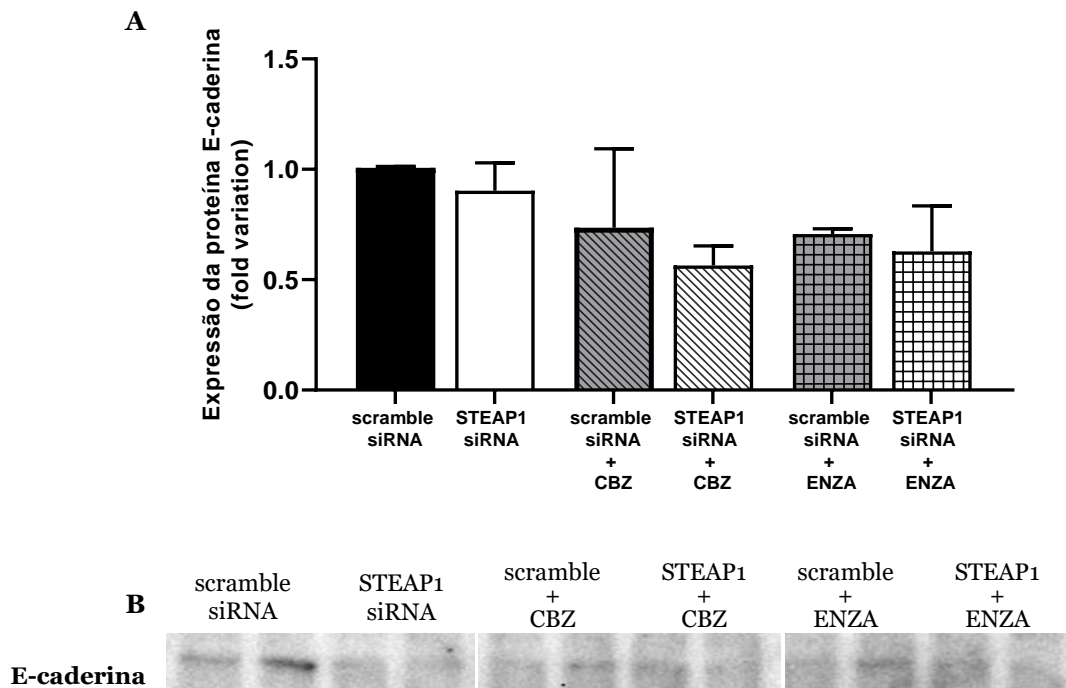
Ainda para avaliar a apoptose, foi analisado os níveis de expressão das proteínas Bax e Bcl-2, através do balanço pró-apoptótico e anti-apoptótico. Conforme pode verificar na figura IV. 7, não foi observada diferença significativa entre a razão Bax/Bcl-2 nos grupos experimentais com ou sem silenciamento da *STEAP1*, sendo apoiado pelo resultado encontrado na expressão da proteína p53 e de mRNA do p21, devido a regulação da apoptose exercida por p53, através da proteína Bax. Como observamos, o c-Myc pode atuar antagonizando os efeitos de p53 e p21. Um estudo avaliou a expressão da proteína Bax em células k562, e observou que os níveis de mRNA e proteína Bax não se alteravam consoante a expressão de c-Myc, mostrando que o mecanismo de regulação negativa da apoptose não ocorria através da Bax (Ceballos *et al.*, 2000).



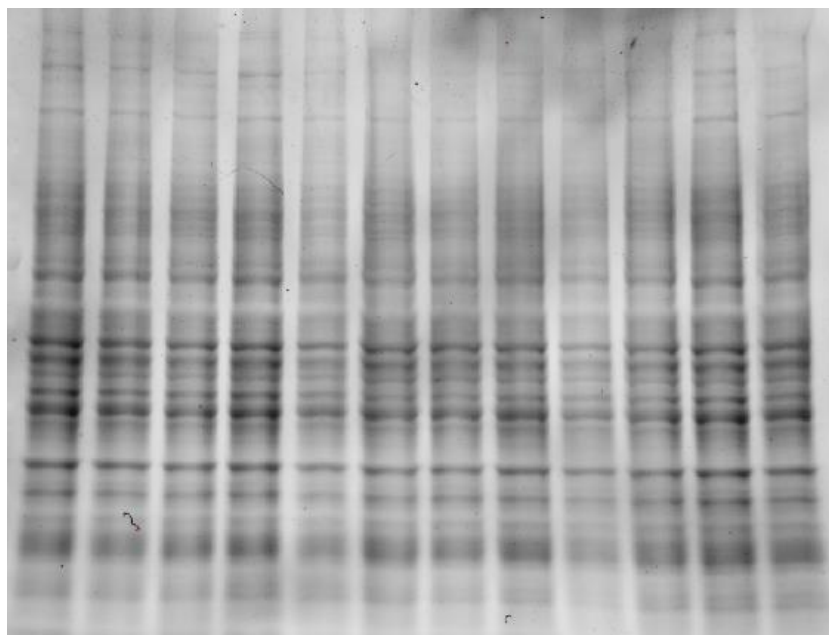
**Figura IV. 7** Efeito do silenciamento do gene *STEAP1* em células LNCaP expostas a cabazitaxel (CBZ) e enzalutamida (ENZA) nos níveis de expressão da proteína Bax e Bcl-2 e o rácio do determinado (A). Em (B) estão representados os immunoblot das proteínas Bax e Bcl-2. As expressões das proteínas foram determinadas por Western Blot normalizando com o gel (C). Os resultados são expressos como variação relativas ao grupo controle (scramble siRNA). As barras de erro indicam a média  $\pm$  SEM (n=1).

## 2.4. Avaliação da STEAP1 na migração e invasão

Avaliamos a capacidade de indução da STEAP1 na transição epitelial para mesenquimal (EMT), através da quantificação da expressão da proteína E-caderina. Os resultados obtidos mostram que não houve diferenças significativas na presença ou ausência do silenciamento da STEAP1 quando associada a terapia farmacológica (figura IV. 8). No entanto, está descrito que a sobreexpressão da STEAP1 induz o aumento da expressão da proteína E-caderina em carcinomas endometriais, cancro de ovário e adenocarcinoma pulmonar (Sun *et al.*, 2019; Huo *et al.*, 2020; Jiao *et al.*, 2020). Buscando em literaturas científicas a avaliação da influência da sobreexpressão de c-Myc na indução de EMT, constatamos que a sobreexpressão de c-Myc também induziu o aumento da expressão da proteína E-caderina no cancro cervical (Bai *et al.*, 2021). Em contrapartida nas células do cancro da mama, c-Myc induziu a diminuição na expressão da E-caderina (Yin *et al.*, 2017). Mais experiências seriam necessárias para avaliar a resposta farmacológica do cabazitaxel e enzalutamida nas células LNCaP silenciadas para o STEAP1 na ação EMT.



C



**Figura IV. 8** Efeito do silenciamento do gene *STEAP1* na migração celular através da avaliação dos níveis de expressão da proteína E-caderina. A expressão da proteína E-caderina foi determinada por Western Blot (A). Em (B) está representado o imunoblot de E-caderina, normalizando com o gel (C). Os resultados são expressos como variação relativas ao grupo controle (scramble siRNA). As barras de erro indicam a média  $\pm$  SEM (n=2).

## V. Conclusão

O nosso estudo demonstrou que a diminuição na viabilidade celular é revertida em células LNCaP, silenciadas para o gene *STEAP1*, quando tratadas com cabazitaxel. Constatamos também que, o silenciamento da *STEAP1* na terapia com cabazitaxel, resultou numa diminuição significativa da expressão de p-c-Myc.

Ainda observamos que a atividade da caspase 3 aumentou significativamente ( $p < 0,01$ ) com silenciamento da *STEAP1*. Entretanto quando associado a terapia farmacológica com o cabazitaxel ou a enzalutamida, ocorreu uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade da caspase 3.

Identificamos que no grupo silenciado para o gene *STEAP1* e tratado com o cabazitaxel, ocorreu um aumento da expressão de mRNA do p21. Todavia apresenta um grande desvio. Porém o grupo silenciado para o gene *STEAP1* e tratado com a enzalutamida foi observado o contrário, pois houve uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) na expressão do mRNA da p21 na amostra silenciada (*STEAP1* siRNA).

De forma geral, estes resultados sugerem uma possível utilidade da sobreexpressão *STEAP1* como biomarcador preditivo ao tratamento do CaP com cabazitaxel ou enzalutamida, visto que os fármacos apresentam menos efeitos terapêuticos quando as células estão silenciadas para a *STEAP1*, ou seja, o facto de sobreexpressar a proteína pode indicar uma melhor eficácia destes fármacos.

## VI. Referências

- Al-Mansouri, L. and Gurney, H. (2019) 'Clinical concepts for cabazitaxel in the management of metastatic castration-resistant prostate cancer', *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 15(6), pp. 288–295. doi: 10.1111/ajco.13193.
- Bai, L. *et al.* (2021) 'Polydatin Inhibits Cell Viability, Migration, and Invasion Through Suppressing the c-Myc Expression in Human Cervical Cancer', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. doi: 10.3389/fcell.2021.587218.
- Barfeld, S. J. *et al.* (2017) 'c-Myc Antagonises the Transcriptional Activity of the Androgen Receptor in Prostate Cancer Affecting Key Gene Networks', *EBioMedicine*. Elsevier B.V., 18, pp. 83–93. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.04.006.
- Barroca-Ferreira, J. *et al.* (2017) 'Targeting STEAP1 Protein in Human Cancer: Current Trends and Future Challenges', *Current Cancer Drug Targets*, 18(3), pp. 222–230. doi: 10.2174/1568009617666170427103732.
- Basu, S. and Tindall, D. J. (2010) 'Androgen Action in Prostate Cancer', *Hormones and Cancer*, pp. 223–228. doi: 10.1007/s12672-010-0044-4.
- Beer, T. M. *et al.* (2017) 'Enzalutamide in Men with Chemotherapy-naïve Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: Extended Analysis of the Phase 3 PREVAIL Study', *European Urology*. Elsevier B.V., 71(2), pp. 151–154. doi: 10.1016/j.eururo.2016.07.032.
- Begemann, D. *et al.* (2020) 'Androgens modify therapeutic response to cabazitaxel in models of advanced prostate cancer', *Prostate*, 80(12), pp. 926–937. doi: 10.1002/pros.24015.
- Berthold, D. R. *et al.* (2004) 'Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: Updated survival in the TAX 327 study', *Journal of Clinical Oncology*, 26(2), pp. 242–245. doi: 10.1200/JCO.2007.12.4008.
- De Bono, J. S. *et al.* (2010) 'Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: A randomised open-label trial', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 376(9747), pp. 1147–1154. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61389-X.
- Braglia, L. *et al.* (2020) 'Deregulated PTEN/PI3K/AKT/mTOR signaling in prostate cancer: Still a potential druggable target?', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1867(9), p. 118731. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118731.
- Ceballos, E. *et al.* (2000) 'c-myc antagonizes the effect of p53 on apoptosis and

p21(WAF1) transactivation in K562 leukemia cells', *Oncogene*, 19(18), pp. 2194–2204. doi: 10.1038/sj.onc.1203541.

Challita-Eid, P. M. *et al.* (2007) 'Monoclonal antibodies to six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 inhibit intercellular communication in vitro and growth of human tumor xenografts in vivo', *Cancer Research*, 67(12), pp. 5798–5805. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3849.

Chen, N. and Zhou, Q. (2016) 'The evolving gleason grading system', *Chinese Journal of Cancer Research*, 28(1), pp. 58–64. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.04.

Chistiakov, D. A. *et al.* (2018) 'New biomarkers for diagnosis and prognosis of localized prostate cancer', *Seminars in Cancer Biology*. Elsevier, 52(December 2017), pp. 9–16. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.01.012.

Cimadamore, A. *et al.* (2020) 'Prostate cancer pathology: What has changed in the last 5 years', *Urologia Journal*, 87(1), pp. 3–10. doi: 10.1177/0391560319876821.

Claassen, G. F. and Hann, S. R. (2000) 'A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor  $\beta$ -induced cell-cycle arrest', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), pp. 9498–9503. doi: 10.1073/pnas.150006697.

Dai, C., Heemers, H. and Sharifi, N. (2017) 'Androgen signaling in prostate cancer', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(9), pp. 1–18. doi: 10.1101/cshperspect.a030452.

Dong, H. *et al.* (2019) 'SOX4 is activated by C-MYC in prostate cancer', *Medical Oncology*. Springer US, 36(11), pp. 1–11. doi: 10.1007/s12032-019-1317-6.

Dunn, M. W. (2017) 'Prostate Cancer Screening', *Seminars in Oncology Nursing*. Elsevier Inc., 33(2), pp. 156–164. doi: 10.1016/j.soncn.2017.02.003.

Evangelisti, C. *et al.* (2020) 'Crosstalks of GSK3 signaling with the mTOR network and effects on targeted therapy of cancer', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1867(4), p. 118635. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118635.

Evans, A. J. (2018) 'Treatment effects in prostate cancer', *Modern Pathology*. Nature Publishing Group, 31, pp. 110–121. doi: 10.1038/modpathol.2017.158.

Feng, X. H. *et al.* (2002) 'Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF- $\beta$ -mediated induction of the CDK inhibitor p15Ink4B', *Molecular Cell*, 9(1), pp. 133–143. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00430-0.

Ferlay, J. *et al.* (2015) 'Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012', *International Journal of Cancer*, 136(5), pp.

E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210.

Fernandez, E. V *et al.* (2015) 'Dual targeting of the androgen receptor and hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  pathways synergistically inhibits castration-resistant prostate cancer cells', *Molecular Pharmacology*, 87(6), pp. 1006–1012. doi: 10.1124/mol.114.097477.

Ferro, M. *et al.* (2016) 'Biomarkers in localized prostate cancer', *Future Oncology*, 12(3), pp. 399–411. doi: 10.2217/fon.15.318.

Fizazi, K. *et al.* (2017) 'Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer', *New England Journal of Medicine*, 377(4), pp. 352–360. doi: 10.1056/nejmoa1704174.

Gartel, A. L. *et al.* (2001) 'Myc represses the p21 (WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), pp. 4510–4515. doi: 10.1073/pnas.081074898.

Gibson, D. A., Saunders, P. T. K. and McEwan, I. J. (2018) 'Androgens and androgen receptor: Above and beyond', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 1–3. doi: 10.1016/j.mce.2018.02.013.

Glass, A. S. *et al.* (2012) 'Role of active surveillance in the management of localized prostate cancer', *Journal of the National Cancer Institute - Monographs*, (45), pp. 202–206. doi: 10.1093/jncimonographs/lgs032.

Gomes, I. M. *et al.* (2014) 'STEAP1 is overexpressed in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia lesions, and it is positively associated with Gleason score', *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier, 32(1), pp. 53.e23–53.e29. doi: 10.1016/j.urolonc.2013.08.028.

Gomes, I. M. *et al.* (2018) 'Knockdown of STEAP1 inhibits cell growth and induces apoptosis in LNCaP prostate cancer cells counteracting the effect of androgens', *Medical Oncology*. Springer US, 35(3), pp. 1–10. doi: 10.1007/s12032-018-1100-0.

Gomes, I. M., Maia, C. J. and Santos, C. R. (2012) 'STEAP proteins: From structure to applications in cancer therapy', *Molecular Cancer Research*, 10(5), pp. 573–587. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0281.

Grunewald, T. G. P., Ranft, A., *et al.* (2012) 'High steap1 expression is associated with improved outcome of ewing's sarcoma patients', *Annals of Oncology*. Elsevier Masson SAS, 23(8), pp. 2185–2190. doi: 10.1093/annonc/mdr605.

Grunewald, T. G. P., Diebold, I., *et al.* (2012) 'STEAP1 is associated with the invasive and oxidative stress phenotype of ewing tumors', *Molecular Cancer Research*, 10(1),

pp. 52–65. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0524.

Gurel, B. *et al.* (2008) ‘Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis’, *Modern Pathology*, 21, pp. 1156–1167. doi: 10.1038/modpathol.2008.111.

Hawksworth, D. *et al.* (2010) ‘Overexpression of C-MYC oncogene in prostate cancer predicts biochemical recurrence’. doi: 10.1038/pcan.2010.31.

Hoxhaj, G. and Manning, B. D. (2020) ‘The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism’, *Nature Reviews Cancer*, pp. 74–88. doi: 10.1038/s41568-019-0216-7.

Hubert, R. S. *et al.* (1999) ‘STEAP: A prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25), pp. 14523–14528. doi: 10.1073/pnas.96.25.14523.

Hunter, I. *et al.* (2018) ‘Tissue control of androgen action: The ups and downs of androgen receptor expression’, *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 465, pp. 27–35. doi: 10.1016/j.mce.2017.08.002.

Huo, S. F. *et al.* (2020) ‘STEAP1 facilitates metastasis and epithelial-mesenchymal transition of lung adenocarcinoma via the JAK2/STAT3 signaling pathway’, *Bioscience Reports*, 40(6). doi: 10.1042/BSR20193169.

Ihlaseh-Catalano, S. M. *et al.* (2013) ‘STEAP1 protein overexpression is an independent marker for biochemical recurrence in prostate carcinoma’, *Histopathology*, 63(5), pp. 678–685. doi: 10.1111/his.12226.

Iijima, K. *et al.* (2021) ‘Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 accelerates cell proliferation by targeting c-Myc in liver cancer cells’, *Oncology Letters*, 22(1), pp. 1–9. doi: 10.3892/ol.2021.12807.

James, N. D. *et al.* (2016) ‘Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): Survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial’, *The Lancet*, 387(10024), pp. 1163–1177. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01037-5.

Jiao, Z. *et al.* (2020) ‘Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 expression promotes ovarian cancer metastasis by aiding progression of epithelial-to-mesenchymal transition’, *Histochemistry and Cell Biology*, 154(2), pp. 215–230. doi: 10.1007/s00418-020-01877-7.

Jung, M. E. *et al.* (2010) ‘Structure-activity relationship for thiohydantoin androgen

- receptor antagonists for castration-resistant prostate cancer (CRPC)', *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(7), pp. 2779–2796. doi: 10.1021/jm901488g.
- Junqueira, L. (2018) *Histologia: texto e atlas*. 13ª edição. Edited by E. G. Koogan. Rio de Janeiro. Available at: [www.grupogen.com.br](http://www.grupogen.com.br).
- Junttila, M. R. and Westermarck, J. (2008) 'Mechanisms of MYC stabilization in human malignancies', *Cell Cycle*, pp. 592–596. doi: 10.4161/cc.7.5.5492.
- Kandil, S. B. *et al.* (2021) 'Synthesis, biological evaluation and X-ray analysis of bicalutamide sulfoxide analogues for the potential treatment of prostate cancer', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 36. doi: 10.1016/j.bmcl.2021.127817.
- Karyadi, D. M. *et al.* (2015) 'Confirmation of genetic variants associated with lethal prostate cancer in a cohort of men from hereditary prostate cancer families', *International Journal of Cancer*, 136(9), pp. 2166–2171. doi: 10.1002/ijc.29241.
- Kohaar, I., Petrovics, G. and Srivastava, S. (2019) 'A rich array of prostate cancer molecular biomarkers: Opportunities and challenges', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8). doi: 10.3390/ijms20081813.
- Komura, K. *et al.* (2018) 'Current treatment strategies for advanced prostate cancer', *International Journal of Urology*, 25(3), pp. 220–231. doi: 10.1111/iju.13512.
- Labbé, D. P. and Brown, M. (2018) 'Transcriptional Regulation in Prostate Cancer', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(11), pp. 1–14. doi: 10.1101/cshperspect.a030437.
- Maia, C. J. B. *et al.* (2008) 'STEAP1 is over-expressed in breast cancer and down-regulated by 17 $\beta$ -estradiol in MCF-7 cells and in the rat mammary gland', *Endocrine*, 34(1–3), pp. 108–116. doi: 10.1007/s12020-008-9113-7.
- Margarida, A. and Cardoso, T. (2020) *Effect of STEAP1 knockdown in LNCaP cells subjected to bicalutamide or docetaxel treatment*. Universidade da Beira Interior. Available at: <https://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/10532>.
- De Marzo, A. M. *et al.* (2016) 'Premalignancy in prostate cancer: Rethinking what we know', *Cancer Prevention Research*, 9(8), pp. 648–656. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-15-0431.
- McAninch, J. W. (2014) *Urologia geral de Smith e Tanagho*. 18ª edição. Edited by AMGH EDITORA LTDA. Porto Alegre.
- McCrea, E. *et al.* (2016) 'Androgen receptor variation affects prostate cancer progression and drug resistance', *Pharmacological Research*. Academic Press, pp. 152–162. doi: 10.1016/j.phrs.2016.10.001.

- Moore, K., Persaud, V. and Torchia, M. (2016) *Embriologia básica*. 9ª edição. Edited by Elsevier Editora Ltda. Rio de Janeiro.
- Moreaux, J. *et al.* (2012) 'STEAP1 is overexpressed in cancers: A promising therapeutic target', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 429(3–4), pp. 148–155. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.123.
- Mucci, L. A. *et al.* (2016) 'Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries', *JAMA*, 315(1), pp. 68–76. doi: 10.1001/jama.2015.17703.
- Nakamura, H. *et al.* (2019) 'Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 protects against increased oxidative stress via a nuclear erythroid 2-related factor pathway in colorectal cancer', *Cancer Gene Therapy*. Springer US, 26(9–10), pp. 313–322. doi: 10.1038/s41417-018-0056-8.
- Ong, X. R. S. *et al.* (2020) 'Understanding the diagnosis of prostate cancer', *Medical Journal of Australia*, 213(9), pp. 424–429. doi: 10.5694/mja2.50820.
- Patel, S. A. and Hoffman-Censits, J. (2017) 'Cabazitaxel in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: Patient selection and special considerations', *OncoTargets and Therapy*, 10, pp. 4089–4098. doi: 10.2147/OTT.S103532.
- Penson, D. F. *et al.* (2016) 'Enzalutamide versus bicalutamide in castration-resistant prostate cancer: The STRIVE trial', *Journal of Clinical Oncology*, 34(18), pp. 2098–2106. doi: 10.1200/JCO.2015.64.9285.
- Perez-Cornago, A. *et al.* (2017) 'Prospective investigation of risk factors for prostate cancer in the UK Biobank cohort study', *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 117(10), pp. 1562–1571. doi: 10.1038/bjc.2017.312.
- Pernar, C. H. *et al.* (2018) 'The Epidemiology of Prostate Cancer', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(12), pp. 1–18. doi: 10.1101/cshperspect.a030361.
- Pettersson, A. *et al.* (2018) 'MYC overexpression at the protein and mRNA level and cancer outcomes among men treated with radical prostatectomy for prostate cancer', *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 27(2), pp. 201–207. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0637.
- Pfaffl, M. W. (2001) *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*, *Nucleic Acids Research*.
- Qiu, X. *et al.* (2021) 'MYC drives aggressive prostate cancer by disrupting transcriptional pause release at androgen receptor targets', *bioRxiv*, p. 2021.04.23.441016. doi: 10.1101/2021.04.23.441016.
- Rawla, P. (2019) 'Epidemiology of Prostate Cancer', *World Journal of Oncology*,

10((2)), pp. 63–89. doi: 10.14740 / wjon1191.

Rebai, A. *et al.* (2020) ‘Evaluation of the Prognostic Value of STEAP1 in Lung Adenocarcinoma and Insights Into Its Potential Molecular Pathways via Bioinformatic Analysis’. doi: 10.3389/fgene.2020.00242.

Reda, I. *et al.* (2018) ‘Deep learning role in early diagnosis of prostate cancer’, *Technology in Cancer Research and Treatment*, 17, pp. 1–11. doi: 10.1177/1533034618775530.

Ríos-Colón, L. *et al.* (2017) *Targeting the stress oncoprotein LEDGF/p75 to sensitize chemoresistant prostate cancer cells to taxanes*. Available at: [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget).

Rocha, S. M. *et al.* (2021) ‘The Usefulness of STEAP Proteins in Prostate Cancer Clinical Practice’, in *Prostate Cancer*, pp. 139–154. doi: 10.36255/exonpublications.prostatecancer.steap.2021.

Ross, M. (2016) *Histologia: texto e atlas*. 7<sup>o</sup> edição. Edited by GUANABARA KOOGAN LTDA. Rio de Janeiro. Available at: [www.editoraguanabara.com.br](http://www.editoraguanabara.com.br).

Rottach, A. M. *et al.* (2019) ‘Cabazitaxel inhibits prostate cancer cell growth by inhibition of androgen receptor and heat shock protein expression’, *World Journal of Urology*. Springer Berlin Heidelberg, 37(10), pp. 2137–2145. doi: 10.1007/s00345-018-2615-x.

Saad, F. (2013) ‘Evidence for the efficacy of enzalutamide in postchemotherapy metastatic castrate-resistant prostate cancer’, *Therapeutic Advances in Urology*, 5(4), pp. 201–210. doi: 10.1177/1756287213490054.

Sato, H. *et al.* (2006) ‘Fluorescence in situ hybridization analysis of c-myc amplification in stage T3N0M0 prostate cancer in Japanese patients’, *International Journal of Urology*, 13(6), pp. 761–766. doi: 10.1111/j.1442-2042.2006.01399.x.

Schalken, J. and Fitzpatrick, J. M. (2016) ‘Enzalutamide: Targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer’, *BJU International*, 117(2), pp. 215–225. doi: 10.1111/bju.13123.

Scher, H. I. *et al.* (2010) ‘Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: A phase 1-2 study’, *The Lancet*, 375(9724), pp. 1437–1446. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60172-9.

Scher, H. I. *et al.* (2012) ‘Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy’, *New England Journal of Medicine*, 367(13), pp. 1187–1197. doi: 10.1056/nejmoa1207506.

SCHOENWOLF, G. C. *et al.* (2016) *Larsen Embriologia Humana*. 5ª edição. Edited by Elsevier Editora Ltda. Rio de Janeiro.

Sears, R. *et al.* (2000) 'Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability', *Genes and Development*, 14(19), pp. 2501–2514. doi: 10.1101/gad.836800.

Shen, M. M. and Abate-Shen, C. (2010) 'Molecular genetics of prostate cancer: New prospects for old challenges', *Genes and Development*, 24(18), pp. 1967–2000. doi: 10.1101/gad.1965810.

Shorning, B. Y. *et al.* (2020) 'The PI3K-AKT-mTOR pathway and prostate cancer: At the crossroads of AR, MAPK, and WNT signaling', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), pp. 1–47. doi: 10.3390/ijms21124507.

Shtivelman, E., Beer, T. M. and Evans, C. P. (2014) 'Molecular pathways and targets in prostate cancer', *Oncotarget*, 5(17), pp. 7217–7259. doi: 10.18632/oncotarget.2406.

Smith, P. *et al.* (1998) 'Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells', *FEBS Letters*, 423(1), pp. 19–24. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00050-7.

Van Soest, Robert J. *et al.* (2015) 'Targeting the androgen receptor confers in vivo cross-resistance between enzalutamide and docetaxel, but not cabazitaxel, in castration-resistant prostate cancer', *European Urology*, 67(6), pp. 981–985. doi: 10.1016/j.eururo.2014.11.033.

Van Soest, R. J. *et al.* (2015) 'The influence of prior novel androgen receptor targeted therapy on the efficacy of cabazitaxel in men with metastatic castration-resistant prostate cancer', *European Journal of Cancer*, 51(17), pp. 2562–2569. doi: 10.1016/j.ejca.2015.07.037.

Sternberg, C. N. *et al.* (2020) 'Enzalutamide and Survival in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer', *New England Journal of Medicine*, 382(23), pp. 2197–2206. doi: 10.1056/nejmoa2003892.

Sun, J. *et al.* (2019) 'Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 is associated with tumor invasion and migration in endometrial carcinomas', *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(7), pp. 11172–11189. doi: 10.1002/jcb.28393.

Sung, H. *et al.* (2021) 'Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.

Taitt, H. E. (2018) 'Global Trends and Prostate Cancer: A Review of Incidence,

- Detection, and Mortality as Influenced by Race, Ethnicity, and Geographic Location', *American Journal of Men's Health*, 12(6), pp. 1807–1823. doi: 10.1177/1557988318798279.
- Tamura, R. E. *et al.* (2020) 'Combination of cabazitaxel and p53 gene therapy abolishes prostate carcinoma tumor growth', *Gene Therapy*. Springer US, 27(1–2), pp. 15–26. doi: 10.1038/s41434-019-0071-x.
- Teo, M. Y., Rathkopf, D. E. and Kantoff, P. (2019) 'Treatment of Advanced Prostate Cancer', *The Annual Review of Medicine*, (70), pp. 479–499. doi: 10.1146/annurev-med-051517-011947.
- Tortora, G. J. (2016) *Princípios de Anatomia e Fisiologia*. 14<sup>o</sup> edição. Edited by EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA. Rio de Janeiro.
- Tsai, J. S., Chao, C. H. and Lin, L. Y. (2016) 'Cadmium activates multiple signaling pathways that coordinately stimulate Akt activity to enhance c-Myc mRNA stability', *PLoS ONE*, 11(1), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0147011.
- Tsao, C. K. *et al.* (2014) 'The role of cabazitaxel in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer', *Therapeutic Advances in Urology*, 6(3), pp. 97–104. doi: 10.1177/1756287214528557.
- Valenti, M. T. *et al.* (2010) 'Zoledronic acid decreases mRNA six-transmembrane epithelial antigen of prostate protein expression in prostate cancer cells', *Journal of Endocrinological Investigation*, 33(4), pp. 244–249. doi: 10.3275/6622.
- Wang, G. *et al.* (2018) 'Genetics and biology of prostate cancer', *Genes and Development*, 32(17–18), pp. 1105–1140. doi: 10.1101/gad.315739.118.
- Wang, L. G. *et al.* (2007) 'Dual action on promoter demethylation and chromatin by an isothiocyanate restored GSTP1 silenced in prostate cancer', *Molecular Carcinogenesis*, 46(1), pp. 24–31. doi: 10.1002/mc.20258.
- Wang, X. *et al.* (2010) 'Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials', *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 95 B(2), pp. 357–364. doi: 10.1002/jbm.b.31723.
- Wein, A. *et al.* (2015) *Campbell-Walsh Urology*. 15<sup>o</sup> editio. Edited by E. H. Sciences. Philadelphia.
- de Wit, R. *et al.* (2019) 'Cabazitaxel versus Abiraterone or Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer', *New England Journal of Medicine*, 381(26), pp. 2506–2518. doi: 10.1056/nejmoa1911206.

- Wu, L. *et al.* (2019) 'Loss of FOXP3 and TSC1 accelerates prostate cancer progression through synergistic transcriptional and posttranslational regulation of c-Myc', *Cancer Research*, 79(7), pp. 1413–1425. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2049.
- Wu, S. *et al.* (2003) 'Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter', *Oncogene*, 22(3), pp. 351–360. doi: 10.1038/sj.onc.1206145.
- Wu, Y. Y. *et al.* (2018) 'STEAP1 regulates tumorigenesis and chemoresistance during peritoneal metastasis of gastric cancer', *Frontiers in Physiology*, 9(AUG), pp. 1–7. doi: 10.3389/fphys.2018.01132.
- Xie, J. *et al.* (2019) 'STEAP1 Inhibits Breast Cancer Metastasis and Is Associated With Epithelial–Mesenchymal Transition Procession', *Clinical Breast Cancer*. Elsevier Inc., 19(1), pp. e195–e207. doi: 10.1016/j.clbc.2018.08.010.
- Yamamoto, T. *et al.* (2013) 'Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 plays a role for in vivo tumor growth via intercellular communication'. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.07.025.
- Yin, S. *et al.* (2017) 'Myc mediates cancer stem-like cells and EMT changes in triple negative breast cancers cells', *PLoS ONE*, 12(8). doi: 10.1371/journal.pone.0183578.
- Zhang, Z. *et al.* (2020) '| INTRODUC TI ON A research of STEAP1 regulated gastric cancer cell proliferation, migration and invasion in vitro and in vivos', *J Cell Mol Med*, 24, pp. 14217–14230. doi: 10.1111/jcmm.16038.